

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
 US Department of Commerce  
 United States Patent and Trademark  
 Office, PCT  
 2011 South Clark Place Room  
 CP2/5C24  
 Arlington, VA 22202  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing (day/month/year)</b> 09 April 2001 (09.04.01)	
<b>International application No.</b> PCT/EP00/07251	<b>Applicant's or agent's file reference</b> M/40076-PCT
<b>International filing date (day/month/year)</b> 27 July 2000 (27.07.00)	<b>Priority date (day/month/year)</b> 27 July 1999 (27.07.99)
<b>Applicant</b> HAUER, Bernhard et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
23 February 2001 (23.02.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer  S. Mafla  Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--

**THIS PAGE BLANK (USPTO,**

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESSENS**

**PCT**

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>M/40076-PCT</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/EP 00/07251</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>27/07/2000</b>	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>27/07/1999</b>
Anmelder  <b>BASF AKTIENGESELLSCHAFT</b>		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.



Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

**1. Grundlage des Berichts**

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.



Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das



in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.



zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.



Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.



Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

**4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung**



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

**5. Hinsichtlich der Zusammenfassung**



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 2



wie vom Anmelder vorgeschlagen



keine der Abb.



weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.



weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/07251

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/53 C12N11/14 C12N11/06 C12N9/02 C12Q1/26  
C12P7/64

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12Q C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, PAJ, CAB Data, STRAND, BIOSIS, EPO-Internal

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>FAULKNER KEVIN M ET AL: "Electrocatalytically driven omega-hydroxylation of fatty acids using cytochrome P450 4A1." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 92, Nr. 17, 1995, Seiten 7705-7709, XP002156161 1995 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1-19



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*G\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

21. Dezember 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

11/01/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hornig, H

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>IWUOHA E I ET AL: "DRUG METABOLISM BIOSENSORS: ELECTROCHEMICAL REACTIVITIES OF CYTOCHROME P450CAM IMMOBILISED IN SYNTHETIC VESICULAR SYSTEMS" JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS,US,NEW YORK, NY, Bd. 17, Nr. 6/07, 1998, Seiten 1101-1110, XP000874063 ISSN: 0731-7085 das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-9
A	<p>GB 2 312 960 A (BRITISH GAS PLC) 12. November 1997 (1997-11-12) das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-9
A	<p>SCHWANEBERG ULRICH ET AL: "A continuous spectrophotometric assay for P450 BM-3, a fatty acid hydroxylating enzyme, and its mutant F87A." ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, Bd. 269, Nr. 2, 1. Mai 1999 (1999-05-01), Seiten 359-366, XP002156030 ISSN: 0003-2697 das ganze Dokument</p> <p>---</p>	20,21
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1996 FANG XIAOQJUN ET AL: "Dithionite-supported hydroxylation of palmitic acid by cytochrome P450BM-3." Database accession no. PREV199799317033 XP002156162 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung &amp; DRUG METABOLISM AND DISPOSITION, Bd. 24, Nr. 11, 1996, Seiten 1282-1285, ISSN: 0090-9556</p> <p>---</p>	1-8
A	<p>GRAHAM-LORENCE SANDRA ET AL: "An active site substitution, F87V, converts cytochrome P450 BM-3 into a regio- and stereoselective (14S,15R)-arachidonic acid epoxxygenase." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 272, Nr. 2, 1997, Seiten 1127-1135, XP002155914 ISSN: 0021-9258 das ganze Dokument</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	11-18

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH GEGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>OLIVER CATHERINE F ET AL: "A single mutation in cytochrome P450 BM3 changes substrate orientation in a catalytic intermediate and the regiospecificity of hydroxylation."            BIOCHEMISTRY,            Bd. 36, Nr. 7, 1997, Seiten 1567-1572,            XP002131694            ISSN: 0006-2960            in der Anmeldung erwähnt            das ganze Dokument</p> <p>---</p>	11-18
A	<p>OLIVER CATHERINE F ET AL: "Engineering the substrate specificity of Bacillus megaterium cytochrome P-450 BM3: Hydroxylation of alkyl trimethylammonium compounds."            BIOCHEMICAL JOURNAL,            Bd. 327, Nr. 2, 1997, Seiten 537-544,            XP002156031            ISSN: 0264-6021            das ganze Dokument</p> <p>---</p>	11-18
A	<p>WO 97 49832 A (UNIV KINGSTON ;PETKOVICH P MARTIN (CA))            31. Dezember 1997 (1997-12-31)            das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

Information on patent family members

PCT/EP 00/07251

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB 2312960      A	12-11-1997	AU      716380 B	24-02-2000
		AU      2707897 A	05-12-1997
		CA      2254352 A	20-11-1997
		CZ      9803588 A	14-04-1999
		EP      0897537 A	24-02-1999
		WO      9743632 A	20-11-1997
		GB      2341181 A,B	08-03-2000
		GB      2341236 A,B	08-03-2000
		JP 2000511630 T	05-09-2000
		PL      329761 A	12-04-1999
		SK      154298 A	13-03-2000
-----			
WO 9749832      A	31-12-1997	US      6063606 A	16-05-2000
		AU      3162097 A	14-01-1998
		AU      3332197 A	14-01-1998
		CA      2257180 A	31-12-1997
		WO      9749815 A	31-12-1997
		EP      0910644 A	28-04-1999
		EP      0935676 A	18-08-1999
		ZA      9705541 A	03-02-1999
		ZA      9705542 A	09-12-1998
		BR      9709924 A	10-08-1999
		-----	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



(6)

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT



(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>M/40076-PCT</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/EP00/07251</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>27/07/2000</b>	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) <b>27/07/1999</b>
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK <b>C12N15/53</b>		
Anmelder <b>BASF AKTIENGESELLSCHAFT et al.</b>		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.  
☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).  
Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags <b>23/02/2001</b>	Datum der Fertigstellung dieses Berichts <b>13.11.2001</b>
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  <b>Strobel, A</b>  Tel. Nr. +49 89 2399 7362 

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**I. Grundlage des Berichts**

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):  
**Beschreibung, Seiten:**

1-70                      ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-22                      ursprüngliche Fassung

**Zeichnungen, Blätter:**

1/10-10/10              ursprüngliche Fassung

**Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:**

53-70, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☒ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/07251

Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung,      Seiten:
- ☐ Ansprüche,      Nr.:
- ☐ Zeichnungen,      Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

## V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-22
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-22
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-22
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen  
**siehe Beiblatt**

## VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:  
**siehe Beiblatt**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**Zu Punkt I**

**Grundlage des Bescheides**

Die beanspruchte Priorität wurde nicht geprüft, weil im internationalen Recherchenbericht kein nach dem Prioritätstag veröffentlichtes Dokument angeführt ist.

**Zu Punkt V**

**Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

Es wird verwiesen auf folgende Dokumente:

D1: FAULKNER KEVIN M ET AL: PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 92, Nr. 17, 1995, Seiten 7705-7709, XP002156161

D2: DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1996 FANG XIAOQJUN ET AL: Database accession no. PREV199799317033 XP002156162 & DRUG METABOLISM AND DISPOSITION, Bd. 24, Nr. 11, 1996, Seiten 1282-1285

**1. Neuheit**

Kein Dokument des Stands der Technik offenbart ein Elektronendonorsystem nach Anspruch 1 oder ein Verfahren zur enzymatischen Übertragung von Sauerstoff. Ansprüche 1-22 sind damit neu (Artikel 33(2) PCT).

**2. Erfinderische Tätigkeit**

D1 als nächster Stand der Technik beschreibt die Hydroxylierung von Fettsäuren durch ein Cytochrom P450 Enzym, wobei NADPH als Elektronendonator und Co(III)sepulchrat als Mediator dienen. Im Unterschied zu D1 ist die Elektronenquelle aus Anspruch 1 anorganisch und nicht elektrodengebunden. Dies bewirkt eine wesentliche Verminderung der Kosten der enzymatischen Redoxreaktion, da NADPH sehr teuer ist. Die Anspruch 1 zugrunde liegende technische Aufgabe ist also die Bereitstellung eines Elektronendonorsystems zur Durchführung enzymatischer Redoxreaktionen, das billiger als die Systeme des Stands der Technik ist. Die Lösung besteht in der Verwendung von Zinkpulver als

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



Elektronenquelle, das Elektronen auf den Mediator Co(III)sepulchrat überträgt, wodurch wiederum ein Cytochrom P450-Enzym reduziert wird. D2 offenbart ein Elektronendonorsystem ohne Mediator mit Dithionit als Elektronenquelle, das direkt Cytochrom P450 BM-3 reduziert und dadurch die Hydroxylierung von Palmitat durch dieses Enzym ermöglicht. Dabei wird das Dithionit nicht regeneriert. D5 weist auf die Möglichkeit hin, NADPH durch diese billige anorganische Elektronenquelle zu ersetzen, erwähnt jedoch nicht Zinkpulver als mögliche Elektronenquelle. Der Fachmann vermag also unter Kombination von D1 mit D5 ein billiges Elektronendonorsystem mit Dithionit als Elektronenquelle sowie Co(III)sepulchrat als Mediator zu erhalten, wird aber nicht dazu veranlaßt, Zinkpulver zu verwenden. Damit sind Ansprüche 1-22 nicht offensichtlich (Erfüllung von Artikel 33(3) PCT).

### **Zu Punkt VIII**

#### **Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

1. Ansprüche 1-5 erfüllen nicht die Anforderungen von Artikel 6 PCT, weil sie die Elektronenquelle unzureichend definieren. Das wesentliche Merkmal der nicht offensichtlichen Erfindung der Anmelderin ist Zinkpulver als Elektronenquelle. Dieses Merkmal wird jedoch in besagten Ansprüchen nicht erwähnt. Außerdem werden die Ansprüche 1-5 nicht, wie in Artikel 6 PCT vorgeschrieben, durch die Beschreibung gestützt, da ihr Umfang über den durch die Beschreibung und die Zeichnungen gerechtfertigten Umfang hinausgeht. Die Gründe dafür sind die folgenden: Ansprüche 1, 4 und 5 beziehen sich auf ein beliebiges Enzym mit Redoxeigenschaften, die Anmeldung offenbart jedoch nur eine Cytochrom P450 Monooxygenase (BM-3 mit Mutanten) als Substrat des Elektronendonorsystems. Ansprüche 2 und 3 definieren weder Mediator noch Elektronenquelle. Damit ist der Gegenstand besagter Ansprüche dem Fachmann nur mit unzumutbarem Aufwand zugänglich.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

101 031241  
**Translation**

PATENT COOPERATION TREATY

**PCT**

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

(PCT Article 36 and Rule 70)

6

Applicant's or agent's file reference <b>M/40076-PCT</b>	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. <b>PCT/EP00/07251</b>	International filing date (day/month/year) <b>27 July 2000 (27.07.00)</b>	Priority date (day/month/year) <b>27 July 1999 (27.07.99)</b>
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC <b>C12N 15/53,</b>		
Applicant <b>BASF AKTIENGESELLSCHAFT</b>		

- This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
- This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.  
☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).  
 These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand <b>23 February 2001 (23.02.01)</b>	Date of completion of this report <b>13 November 2001 (13.11.2001)</b>
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/07251

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☒ the description:  
pages 1-70, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the claims:  
pages 1-22, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the drawings:  
pages 1/10 - 10/10, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the sequence listing part of the description:  
pages 53 - 70, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/07251

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

The claimed priority was not examined because the international search report does not cite any document published after the priority date.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/EP 00/07251

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-22	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-22	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-22	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

This report makes reference to the following documents:

- D1: FAULKNER KEVIN M. ET AL.: PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Vol. 92, No. 17, 1995, pages 7705-7709, XP002156161
- D2: DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1996, FANG XIAOQJUN ET AL.: Database accession No. PREV199799317033, XP002156162 & DRUG METABOLISM AND DISPOSITION, Vol. 24, No. 11, 1996, pages 1282-1285.

#### 1. Novelty

No prior art document discloses an electron donor system as per Claim 1 or a method for the enzymatic transfer of oxygen. Claims 1-22 are therefore novel (PCT Article 33(2)).

#### 2. Inventive step

D1, the closest prior art, describes the hydroxylation of fatty acids by a cytochrome P450 enzyme, in which method NADPH is used as electron donor and Co(III)sepulchrates as mediator. Unlike in D1, the electron source in Claim 1 is inorganic and not electrode-bound. This considerably reduces the

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

costs of the enzymatic redox reaction, since NADPH is very expensive. Claim 1 therefore addresses the technical problem of providing an electron donor system for carrying out enzymatic redox reactions that is less expensive than the prior art system. The solution consists in using zinc powder as electron source for transferring electrons to the mediator Co(III)sepulchrates, in turn reducing a cytochrome P450 enzyme. D2 discloses an electron donor system without mediator in which dithionite is used as electron source and which directly reduces cytochrome P450 BM-3, thus enabling palmitate to be hydroxylated by this enzyme. Dithionite is not regenerated therein. D5 points out the possibility of replacing NADPH by this inexpensive inorganic electron source but does not mention zinc powder as a possible electron source. A person skilled in the art may therefore produce an inexpensive electron donor system with dithionite as electron source and Co(III)sepulchrates as mediator, by combining D1 with D5, but he is not induced to use zinc powder. Claims 1-22 are therefore not obvious and comply with PCT Article 33(3).

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**VIII. Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. Claims 1-5 do not meet the requirements of PCT Article 6 because they do not sufficiently define the electron source. The essential feature of the non-obvious invention is the use of zinc powder as electron source. However, these claims do not mention this feature. Moreover, Claims 1-5 are not supported by the description, thereby contravening PCT Article 6, because their scope extends beyond the scope justified by the description and the drawings. The reasons therefor are as follows: Claims 1, 4 and 5 concern any enzyme with redox properties, although the application discloses only a cytochrome P450 monooxygenase (BM-3 with mutants) as substrate for the electron donor system. Claims 2 and 3 do not define a mediator or an electron source. A person skilled in the art needs therefore to apply an unacceptable effort in order to determine the subject matter of these claims.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(12) NACH DEM VERT ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMM ARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
1. Februar 2001 (01.02.2001)

PCT

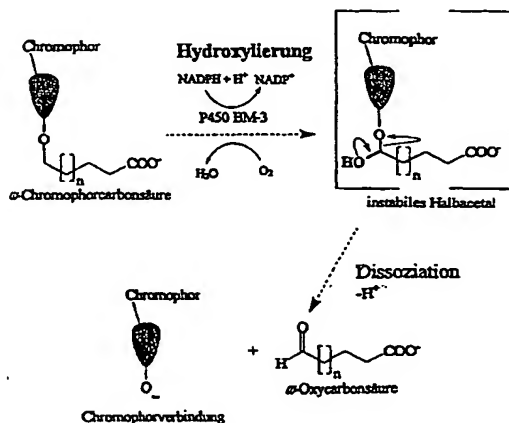
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/07573 A1**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 9/00 (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/07251 (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HAUER, Bernhard [DE/DE]; Merowingerstrasse 1, D-67056 Fussgönheim (DE). SCHMID, Rolf, D. [DE/DE]; Allmandring 31, D-70569 Stuttgart (DE). SCHWANEGER, Ulrich [DE/DE]; Uhlandstrasse 15, D-71336 Waiblingen (DE).
- (22) Internationales Anmeldedatum: 27. Juli 2000 (27.07.2000) (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 199 35 115.5 27. Juli 1999 (27.07.1999) DE 100 11 723.6 10. März 2000 (10.03.2000) DE (74) Anwälte: KINZEBACH, Werner usw.; Reitsötter, Kinzebach & Partner, Sternwartstrasse 4, D-81679 München (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

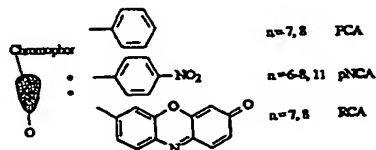
(54) Title: ELECTRON DONOR SYSTEM FOR ENZYMES AND ITS USE FOR THE BIOCHEMICAL CONVERSION OF SUBSTRATES

(54) Bezeichnung: ELEKTRONENDONORSYSTEM FÜR ENZYME UND DESSEN ANWENDUNG BEI DER BIOCHEMISCHEN UMSETZUNG VON SUBSTRATEN



(57) Abstract: The invention relates to a novel electron donor system for enzymes with redox properties and to its use in enzyme-catalyzed oxidation reactions, such as the production of ω hydroxylated fatty acids. The invention further relates to an improved analysis method for fatty acid monooxygenases and to bioreactors and test kits wherein the inventive electron donor system is advantageously used.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein neuartiges Elektronendonorsystem für Enzyme mit Redox Eigenschaften, und dessen Verwendung in enzymkatalysierten Oxidationsreaktionen, wie insbesondere der Herstellung ω hydroxylierter Fettsäuren. Die Erfindung betrifft außerdem ein verbessertes Nachweisverfahren für Fettsäuremonooxygenasen, Bioreaktoren sowie Testkits, worin das Elektronendonorsystem vorteilhaft einsetzbar ist.



AA...CHROMOPHORE  
AB...HYDROXYLATION  
AC... ω CHROMOPHORUS CARBOXYLIC  
ACID  
AD...CHROMOPHOROUS COMPOUND  
AE... ω OXYCARBOXYLIC ACID  
AF...DISSOCIATION  
AG...UNSTABLE HEMIACETAL

WO 01/07573 A1



(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AU, CA, CN, JP, NO, US.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

**Veröffentlicht:**

— Mit internationalem Recherchenbericht.

— Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



## Elektronendonorsystem für Enzyme und dessen Anwendung bei der biochemischen Umsetzung von Substraten

- 5 Die Erfindung betrifft ein neuartiges Elektronendonorsystem für Enzyme mit Redoxeigenschaften und dessen Verwendung in enzymkatalysierten Oxidationsreaktionen, wie insbesondere der Herstellung  $\omega$ -hydroxylierter Fettsäuren. Die Erfindung betrifft außerdem ein verbessertes Nachweisverfahren für Fettsäuremonooxygenasen, Bio-  
10 reaktoren sowie Testkits, worin das Elektronendonorsystem vorteilhaft einsetzbar ist.

Die biotechnologische Nutzung von Enzymen mit Redoxeigenschaften, wie z.B. von Monooxygenasen, in zellfreien Reaktionssystemen ist  
15 grundsätzlich mit dem Problem behaftet, daß die Verwendung natürlicher Cofaktoren zur Bereitstellung der erforderlichen Redox-Äquivalente (wie z.B. von NADH oder NADPH) mit unvertretbar hohen Kosten verbunden ist.

- 20 Dies gilt auch für die biotechnologische Nutzung von Cytochrom P450-haltigen Monooxygenasen. Funktionell ist allen P450-Enzymen gemeinsam, Sauerstoffatome auf nicht aktivierte aliphatische oder aromatische X-H (X = -C, -N, -S) Bindungen zu übertragen. Darüber hinaus vermögen P450-Enzyme -C=C- Doppelbindung zu epoxidieren.  
25 Für diese Oxygenierungsreaktionen benötigen die meisten P450-Systeme Cofaktoren, wie NADPH oder NADH, als Elektronenquelle. Entsprechend der Realisierung dieses Elektronen-Transfersystems (Reduktasesystems) unterteilt man P450-Systeme in vier Klassen. Klasse I P450-Enzyme enthalten als Reduktase eine FAD-Domäne und  
30 ein weiteres Fe-S-Protein (zumeist mitochondriale und bakterielle P450-Enzyme), Klasse II P450-Enzyme besitzen eine FAD/FMN-Reduktase (meist ER-P450-Enzyme) und Klasse III P450-Enzyme benötigen keine weiteren Reduktionsäquivalente, sie setzen peroxygenierte Substrate um, die den Sauerstoff bereits enthalten. Das einzige  
35 P450-Enzym der Klasse IV erhält seine Elektronen direkt ohne Transfersystem von NADH.

- Die funktionelle Vielfalt der durch P450-Systeme katalysierten Monooxygenierungen auf chemischem Wege häufig nur schwer zugäng-  
40 licher Verbindungen bietet ein enormes biotechnologisches, pharmakologisches und toxikologisches Potential. Eine wichtige Voraussetzung zur *in vitro* Nutzung dieser Potentiale ist die Entwicklung geeigneter Expressions-, Reinigungs- und vor allem Aktivitätsnachweissysteme, die erlauben, P450-Systeme zu charakteri-  
45 sieren und Enzymvarianten mit "verbesserten" Eigenschaften aufzufinden.

Weitere wichtige Voraussetzung für die Nutzung dieser P450-Monooxygenasen, insbesondere der Klassen I und II, wäre die Verfügbarkeit eines kostengünstigen Elektronendonorsystems.

- 5 Ein NADPH-Cofaktor-Recycling-System wurde von Deffner et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. (1987) 501, 171 vorgestellt. Dieses stellt aber bei Anwendung im präparativen Maßstab ein Kostenproblem dar und gestaltet Reaktionsführungen in Enzym-Membran-Reaktoren komplizierter. Deshalb wurde nach alternativen Elektronendonoren
- 10 gesucht. Ein vielversprechenden Weg stellt die elektrochemische Reduktion von P450-Enzymen dar. Estabrook et al. (Methods Enzymol. (1996) 272, 44) konnten mittels eines Co(III)sepulchrat-Mediator-systems und Pt-Elektroden für sechs verschiedene P450-Enzyme Umsätze bestimmen. Die Aktivitäten waren jedoch etwa 8-fach
- 15 geringer als beim Reduktionsäquivalent NADPH. Statt des Mediators wurde in Natriumdithionit (Fang et al., Drug. Metab. Dispos. (1996) 24(11): 1282) eine Verbindung gefunden, die P450-Enzyme direkt reduziert. Im Falle von P450 BM-3 war die Aktivität mit Natriumdithionit gegenüber NADPH um Faktor 8150
- 20 reduziert; vermutlich wird P450 BM-3 durch Natriumdithionit dreifach reduziert und damit großteils inaktiviert.

- 25 Eine erste Aufgabe der Erfindung war es daher, ein kostengünstiges, effizientes, alternatives Elektronendonorsystem für Enzyme mit Redoxeigenschaften bereitzustellen. Insbesondere sollte dieses System in biochemischen Umsetzungen verwendbar sein, an welchen Cytochrom P450-haltige Enzyme beteiligt sind.
- 30 Außerdem sollte ein verbessertes Nachweisverfahren für p450-Enzyme bereitgestellt werden. Eine weitere Aufgabe der Erfindung bestand in der Bereitstellung eines verbesserten biotechnologischen Verfahrens zur enzymatischen Übertragung von Sauerstoff auf organische Moleküle und insbesondere zur
- 35 terminalen oder subterminalen Hydroxylierung von Hydrocarbylverbindungen mit polarem Gruppe, wie insbesondere Fettsäuren.

- Diese Aufgaben wurden überraschenderweise gelöst durch Bereitstellung eines Elektronendonorsystems für die Übertragung
- 40 von Elektronen auf Enzyme mit Redox-Eigenschaften, das dadurch gekennzeichnet ist, daß das System eine anorganische, nicht elektrodengebundene Elektronenquelle und einen Mediator umfaßt, der zur Übertragung von Elektronen von der Elektronenquelle auf das Enzym befähigt ist. Dabei können die Komponenten des Systems
- 45 einzeln oder im Gemisch, in geträgerter oder vorzugsweise ungeträgerter Form vorliegen.

Eine "nicht elektrodengebundene Elektronenquelle" im Sinne der Erfindung ist ohne Anlegen einer externen Spannung zwischen einem Elektrodenpaar zur Abgabe von Elektronen an den Mediator befähigt. Insbesondere wird dabei der Mediator durch die Elektronen-  
5 quelle über eine chemische Redoxreaktion reduziert.

Das erfindungsgemäß bereitgestellte Elektronendonorsystem ist insbesondere für Cytochrom P450-haltige Enzyme, wie z.B. die in der großen Familie der Monooxygenasen (E.C. 1.14.--)  
10 zusammengefassten Enzyme, anwendbar. Als nicht limitierendes Beispiel sei hier die aus dem *Bacillus megaterium* isolierbare Cytochrom P450-Monooxygenase BM-3 genannt.

In einer bevorzugten Ausführungsform des Elektronendonorsystems  
15 umfaßt dieses einen Mediator mit einem Standard-Normalpotential (z.B. gemessen gegen Kalomel-Elektrode; unter Standardbedingungen; vgl. unten Caesar et al.) im Bereich von weniger als etwa -0,4 V. Nichtlimitierende Beispiele für erfindungsgemäß brauchbare Mediatoren sind Kobalt(III)sepulchrat, Methylviologen,  
20 Neutralrot, Riboflavin, Rutheniumtriacetat, FMN und FAD, wobei Kobalt(III)sepulchrat bevorzugt ist. Kobalt(III)sepulchrat besitzt beispielsweise unter Standardbedingungen ein Normalpotential von -0,54 V (vgl. Caesar et al. (1977), J. Am. Chem. Soc., 99, 3181).

25 Das erfindungsgemäße Elektronendonorsystem umfaßt vorzugsweise als Elektronenquelle ein Metall mit einem niedrigeren Standard-Normalpotential als der Mediator. Als nichtlimitierendes Beispiel für die Elektronenquelle ist metallisches Zink zu  
30 nennen. Das Metall liegt dabei vorzugsweise in einer reaktiven Form, d.h. mit großer Oberfläche, wie z.B. pulverförmig, vor.

Bevorzugte erfindungsgemäße Elektronendonorsysteme umfassen folgende Kombinationen von Elektronenquelle und Mediator:

- 35
- Zn/Kobalt(III)sepulchrat oder
  - Zn/Neutralrot.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein Verfahren zur  
40 enzymatischen Oxidation von, d.h. Übertragung von Sauerstoff auf ein Kohlenwasserstoff-haltiges Wasserstoffdonor-Molekül (d.h. eine oxidierbare Verbindung), das dadurch gekennzeichnet ist, daß man das Wasserstoff-Donormolekül in einem Reaktionsmedium, umfassend das Sauerstoff-übertragenden Enzym und ein  
45 Elektronendonorsystem gemäß obiger Definition, in Gegenwart von Sauerstoff unter Reaktionsbedingungen inkubiert.

Eine "Oxidation" im Sinne der vorliegenden Erfindung betrifft enzymkatalysierte Oxidationsreaktionen im weitesten Sinne. Insbesondere umfaßt der Begriff Oxidationsreaktionen welche von Enzymen aus der Klasse der Monooxygenasen (E.C.1.14.--.) und vor  
5 allem von Cytochrom P450-Enzymen katalysiert werden. Diese Oxidationsreaktionen umfassen:

- a) Kohlenstoff-Oxidationen an gesättigten oder ungesättigten, aliphatischen oder aromatischen Kohlenstoffatomen, wie z.B.  
10 Hydroxylierungen und Epoxidierungen;
- b) Schwefel-Oxidationen;
- c) Stickstoff-Oxidationen;
- d) oxidative Dealkylierungen; und
- e) oxidative Dehalogenierungen.

15

Dabei ist das Wasserstoff-Donormolekül vorzugsweise ausgewählt unter Verbindungen der Formel



20

worin

R für einen geradkettigen oder verzweigten, vorzugsweise geradkettigen, Alkylrest mit 8 oder mehr Kohlenstoffatomen,  
25 wie z.B. 10 bis 30 Kohlenstoffatomen, steht, und

X für eine polare, zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken befähigte Gruppe, vorzugsweise eine Carboxy-, Amid-, Nitril, Sulfat-, Sulfon-, Amin- oder Hydroxygruppe, steht.

30

Eine bevorzugte Variante obigen Verfahrens betrifft die enzymatische Herstellung terminal oder subterminal (d.h. in Position  $\omega-1$  bis  $\omega-4$ ) hydroxylierter Fettsäuren, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man

35

- a) eine hydroxylierbare Fettsäure oder ein hydroxylierbares Fettsäurederivat in Gegenwart eines Elektronendonorsystems gemäß obiger Definition mit einer Cytochrom P450 Monooxygenase und Sauerstoff umgesetzt; und
- 40 b) das (die) hydroxylierte(n) Produkt(e) isoliert.

Die  $\omega$ -hydroxylierbare (d.h. terminal oder subterminal hydroxylierbare) Fettsäure bzw. deren Derivat ist erfindungsgemäß bevorzugt ausgewählt unter bzw. abgeleitet von terminal  
45 gesättigten, verzweigten oder unverzweigten Fettsäuren mit 8 oder mehr, wie z.B. mehr als 10 Kohlenstoffatomen, insbesondere  $C_{12}$  -  $C_{30}$ -Fettsäuren. Als nichtlimitierende Beispiele für erfindungsge-

mäß hydroxylierbare Fettsäuren sind diese zu nennen: Capryl-, Pelargon-, Undecan-, Laurin-, Tridecan-, Myristin-, Pentadecan-, Palmitin-, Margaritin-, Stearin-, Nonadecan-, Arachin-, Behen-, Lignocerin-, Cerotin- und Melissinsäure.

5

Beispiele für geeignete Fettsäurederivate sind C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkylester, Amide oder Anhydride mit vorzugsweise kurzkettigen, insbesondere C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Carbonsäuren.

10 In den oben beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren verwendet man bevorzugte als Enzym eine Cytochrom P450 Monooxygenase, die ausgewählt ist unter:

- Cytochrom P450 Monooxygenasen der Enzymklasse E.C. 1.14.--., insbesondere aus der P450-Familie CYP102, eukaryotischen oder
- 15 prokaryotischen, insbesondere bakteriellen Ursprungs, und vorzugsweise dem aus *Bacillus megaterium* (DSM 32T) isolierbaren Wildtypenzym; oder
- einer Mutante davon.

20 Eine bevorzugte Gruppe von Mutanten ist abgeleitet von Cytochrom P450 Monooxygenase BM-3 aus *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:35, welche wenigstens eine funktionale Mutation in einem der folgenden Aminosäuresequenzbereiche aufweist: 24-28, 45-51, 70-72, 73-82 (helix 5), 86-88 (helix 6),

25 172-224 (F/G-loop) und 352-356 (β-strand 8); sowie funktionale Äquivalente dieser Mutanten.

Eine "funktionale Mutation" im Sinne der vorliegenden Erfindung umfasst einen Aminosäureaustausch in den genannten Sequenzberei-

30 chen, welcher zu einer Mutante führt, die weiterhin zur Katalyse einer der oben genannten Oxidationsreaktionen wie z.B. Hydroxylierungen befähigt ist.

Besonders bevorzugt sind erfindungsgemäß P450 BM-3-Monooxygenase-

35 Mutanten, welche wenigstens je eine funktionale Mutation in den Aminosäuresequenzbereichen 86-88, 172-224, 73-82, 45-51, 24-28 70-72 und 352-356 auf (gemäß SEQ ID NO: 35) einzeln oder in Kombination umfassen.

40 Insbesondere kann eine Aminosäuresubstitution in wenigstens einer der Positionen 26, 47, 72, 74, 87, 188 und 354 gemäß SEQ ID NO: 35 des Wildtypenzyms vorliegen.

So kann beispielsweise Phe87 ersetzt sein durch eine Aminosäure

45 mit aliphatischer Seitenkette, wie z. B. Ala, Val, Leu, insbesondere Val oder Ala; Leu188 kann ersetzt sein durch eine Aminosäure mit Amin- oder Amid-Seitenkette, wie z. B. Asn, Gln, Arg oder

insbesondere Lys, oder Aminosäuren wie Ala, Gly, Ser und Trp; Ala74 kann ersetzt sein durch eine andere Aminosäure mit aliphatischer Seitenkette, wie z. B. Val und insbesondere Gly; Arg47 kann ersetzt sein durch eine Aminosäure mit ringförmiger Seiten-  
 5 gruppe, wie z.B. His, Tyr oder insbesondere Phe; und Val26 kann ersetzt sein durch eine Aminosäure mit Hydroxyl-Seitengruppe, wie z.B. Ser oder insbesondere Thr. Beispielsweise kann Ser72 ersetzt sein durch eine Aminosäure mit aliphatischer Seitenkette, wie z. B. Ala, Val, Leu, Ile und insbesondere Gly, und Met354 kann er-  
 10 setzt sein durch eine Aminosäure mit Hydroxyl-Seitengruppe, wie z.B. Ser oder insbesondere Thr.

Beispiele für Mutanten sind:

- a) F87V;
  - 15 b) F87A, L188K;
  - c) F87V, L188K;
  - d) F87A, L188K; A74G;
  - e) F87V, L188K, A74G;
  - f) F87A, L188K, A74G, R47F;
  - 20 g) F87V, L188K, A74G, R47F;
  - h) F87A, L188K, A74G, R47F, V26T; oder
  - i) F87V, L188K, A74G, R47F, V26T;
  - k) V26T,
  - l) R47F,
  - 25 m) S72G,
  - n) A74G,
  - o) F87A
  - p) L188z, worin z für K, R, W, Q, N, G, A oder S steht, und
  - 30 q) M354T;
- sowie funktionale Äquivalente davon.

Geeignete Mutanten sind beispielsweise auch beschrieben in der älteren DE-A-100 11 723, worauf hiermit Bezug genommen wird

35

Die eingesetzten Mutanten und funktionalen Äquivalente können dabei im Vergleich zum Wildtyp-Enzym ein "verändertes Substratprofil" zeigen.

40 Ein "verändertes Substratprofil" bedeutet in Rahmen der vorliegenden Erfindung insbesondere :

- a) eine Veränderung der Reaktivität, wie z. B. eine Erhöhung der spezifischen Aktivität (ausgedrückt als nmol umgesetztes Substrat/Minute/nmol P450-Enzym) und/oder wenigstens eines kineti-  
 45 schen Parameters, ausgewählt unter  $K_{cat}$ ,  $K_m$  und  $K_{cat}/K_m$ , z.B. um

- mindestens 1 %, wie z. B. 10 bis 1000 %, 10 bis 500 %, oder 10 bis 100 %, der Mutante gegenüber zumindest einem oxidierbaren Substrat im Vergleich zum Wildtyp-Enzym; und/oder
- b) eine Veränderung der Regioselektivität, wie insbesondere eine
- 5 Verschiebung der bevorzugten Position der Oxidationsreaktion; Dabei kann z.B. die bevorzugte terminale oder subterminale ( $\omega$ -1,  $\omega$ -2,  $\omega$ -3,  $\omega$ -4, insbesondere  $\omega$ -1 bis  $\omega$ -3) Hydroxylierungsposition an wenigstens einer hydroxylierbaren Carbonsäure oder einem hydroxylierbaren Derivat einer aliphatischen Carbonsäure verschoben
- 10 sein. Die Veränderung des Substratprofils kann dabei über den gesamten Größenbereich (d. h. C<sub>8</sub>-C<sub>30</sub>) oder nur in Teilbereichen, z. B. bei C<sub>8</sub>-C<sub>12</sub>-, C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub>-, C<sub>12</sub>-C<sub>30</sub>-, C<sub>12</sub>-C<sub>25</sub>- oder C<sub>12</sub>-C<sub>20</sub>-Carbonsäuren oder bei einzelnen Carbonsäuren aus diesen Teilbereichen ausgeprägt sein.
- 15 Unter "funktionalen Äquivalenten" versteht man erfindungsgemäß auch Mutanten, welche in wenigstens einer der oben genannten Sequenzpositionen eine andere als die konkret genannte Aminosäuresubstitution aufweisen, aber trotzdem zu einer Mutante führen,
- 20 die ebenso wie die konkret genannte Mutante eine der oben definierten Oxidationsreaktionen katalysiert.

Funktionale Äquivalenz ist insbesondere auch dann gegeben, wenn die Veränderungen im Reaktivitätsmuster qualitativ übereinstimmen.

25 men.

- "Funktionale Äquivalente" umfassen natürlich auch P450-Monooxygenase-Mutanten, welche in gleicher Weise wie die konkret genannten P450 BM3-Mutanten durch Mutation von P450-Enzymen aus anderen Organismen zugänglich sind. Beispielsweise lassen sich durch Sequenzvergleich Bereiche homologer Sequenzregionen festlegen. Mit den modernen Methoden des Molecular Modeling können dann in Anlehnung an die konkreten Vorgaben der Erfindung Äquivalente, das Reaktionsmuster beeinflussende Mutationen vorgenommen werden.
- 30

- 35 "Funktionale Äquivalente" umfassen ebenso die durch eine oder mehrere zusätzliche Aminosäure-Additionen, -Substituenten, -Deletionen und/oder -Inversionen erhältlichen Mutanten, wobei die genannten zusätzlichen Veränderungen in jeglicher Sequenzposition
- 40 auftreten können, solange sie zu einer Mutante mit "verändertem Substratprofil" im obigen Sinne führen.

- Bevorzugt eingesetzte Mutanten umfassen eine Mutation in Position 87 und sind ausgewählt unter den Mutationen F87A und F87V die
- 45 gegebenenfalls wenigstens eine weitere der folgenden Mutationen aufweist: L188K, A74G, R47F und V26T. Besonders bevorzugt ist die Einfachmutante F87A und die Fünffachmutante F87A, L188K, A74G,

R47F, V26T (Angabe der Aminosäuren im Einbuchstaben-Code; ursprüngliche Aminosäure links von der Positionsangabe; neue Aminosäure rechts von der Positionsangabe).

- 5 Vorzugsweise werden obige Verfahren unter Verwendung des Elektronendonorsystem Zink/Co(III)sepulchrat durchgeführt.

In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens führte man die Umsetzung in Gegenwart von Chloridionen durch.

10

Außerdem kann die Gegenwart eines Wasserstoffperoxyd-spaltenden Enzyms, wie z.B. Katalase, vorteilhaft sein.

- Eine weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft einen Bioreaktor zur Verwendung bei der enzymatischen Übertragung von Sauerstoff auf ein Kohlenwasserstoff-haltiges Wasserstoffdonor-Molekül, und insbesondere zur Verwendung bei der Herstellung  $\omega$ -hydroxylierter Fettsäuren, der gekennzeichnet ist durch eine immobilisierte Monooxygenase (z.B. immobilisiert an einem Trägermaterial, wie  
15 z.B. DEAE 650M oder Super Q650M) und ein Elektronendonorsystem gemäß obiger Definition im flüssigen Reaktionsmedium. Die spezielle Ausgestaltung des Reaktors erfolgt in Anlehnung an üblichem Fachwissen.  
20

- 25 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein Nachweisverfahren für Fettsäure-Monooxygenasen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man

- a) einen Analyten, in dem man Enzymaktivität vermutet, mit einer  
30  $\omega$ -hydroxylierbaren Fettsäure oder Fettsäurederivat, welche(s) einen terminalen, abspaltbaren Fluorophors oder Chromophor trägt, in Gegenwart eines Elektronendonorsystems gemäß obiger Definition inkubiert; und  
35 b) die Abspaltung des Fluorophors oder Chromophors qualitativ oder quantitativ bestimmt.

- Als Analyt kommt beispielsweise ein Zellhomogenat, z.B. eines Bakterienstammes, in Betracht. Mit Hilfe des erfindungsgemäßen  
40 Nachweisverfahrens können so z.B. Stammsammlungen auf Enzymaktivität durchmustert werden.

- Die Reaktion führt man dabei bevorzugt in Gegenwart eines Wasserstoffperoxyd-spaltenden Enzyms und gegebenenfalls in  
45 Gegenwart von Chloridionen durch.



Beispiele für geeignete Fluorophore und Chromophore sind Phenole, Catechole, Hydroxycoumarine, wie Umbelliferon, Phenoxazine und insbesondere Resorufin.

- 5 Die Einstellung der optimalen Verfahrensparameter für die oben beschriebenen enzymatischen Umsetzungen und Nachweisreaktionen ist unter Berücksichtigung der Anweisungen im folgenden experimentellen Teil ohne weiteres möglich. So ist z.B., ohne darauf beschränkt zu sein, eine Cobalt(III)sepulchrat-Konzentration von mehr als 0,1 mM, wie z.B. 0,5 bis 1,0 mM besonders vorteilhaft; ebenso wie ein pH-Wert etwa 8 bis 8,5; eine Zink-Konzentration von mehr als etwa 2mg/ml wie z.B. etwa 5 bis 50 mg/ml. Das Wasserstoffperoxid-spaltende Enzym kann z.B. in Mengen von etwa 10 bis 5000 U/ml eingesetzt werden.
- 10
- 15 Schließlich betrifft die Erfindung als weiteren Gegenstand einen Testkit, insbesondere zur Durchführung des obigen Nachweisverfahrens für Carbonsäure-Monooxygenasen, umfassend ein Elektronendonorsystem nach obiger Definition.
- 20 Die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten der vorliegenden Erfindung werden in den folgenden Abschnitten weiter erläutert.

Katalysierte Reaktionen von P450-Systemen und Beispiele  
25 industrieller Anwendungen in der Feinchemikaliensynthese:

- In Organismen dienen Cytochrom P450-Enzyme unter anderem der Ergosterol-Synthese, der Biosynthese von Insekten- und Phytohormonen, der Ausbildung von Fruchtreife, Geruch und Farbe bei Pflanzen, der Biosynthese von Gluko- und Mineralkortikoiden, der Aromatisierung von Androgenen zu Östrogenen, dem Metabolismus von Retinoiden zur Regulation von normalem und epitheliale
- 30 Wachstum/Differenzierung, Arachidonsäurestoffwechsel zur Bildung von Prostaglandinen, Leukotrienen und Thromboxanen und der Bildung vasoaktiver Produkte. Darüber hinaus dienen sie zur Aktivierung und Detoxifizierung xenobiotischer Stoffe.
- 35

- P450-Enzyme gehören zu den sogenannten Phase I Enzymen, die mittels Oxygenierungen wasserunlösliche oder schwer lösliche Verbindungen zur weiteren Metabolisierung vorbereiten. Dazu dienen Phase II Enzyme wie Glutathion-Transferasen, N-Acetyltransferase oder Sulfotransferase, die eine polare Gruppe an jene hydroxylierten oder epoxidierten Verbindungen addieren. Dadurch werden diese Metabolite wasserlöslich und somit
- 40 bioverfügbar. Die Vielfalt von Reaktionen, die durch Cytochrom P450-Enzyme katalysiert werden, sind im folgenden zusammengefaßt und hinsichtlich ihrer wirtschaftlichen und funktionellen
- 45

Bedeutung diskutiert. Eine Übersicht, aufgeschlüsselt anhand ausgewählter Familien findet sich in Tabelle 1.

5 Tabelle 1

	P450-Familie	Reaktionen von P450 Enzymen
10	CYP1-3	Metabolisierung xenobiotischer Stoffe; CYP1: PCB, PAH, Dioxine, Aflatoxine; CYP2: Pflanzentoxine, Pestizide; CYP3: Cyclosporine, Erythromycin, ferner beteiligt am Steroidmetabolismus
15	CYP4, CYP52, CYP102	CYP4, CYP52, CYP102: terminale und/oder subterminale Oxidation von Fettsäuren CYP4: Oxidation von Eicosanoiden (Prostaglandinen, Leukotrienen und Thromboxanen)
20	CYP11, CYP17, CYP21	Biosynthese von Gluko- und Mineralcorticoiden; CYP11: 11 $\beta$ -Hydroxylasen, Hydroxylierung von Deoxycorticosteron oder Deoxycortisol; CYP17: Steroid-17 $\alpha$ -hydroxylase; CYP21: Steroid-21-hydroxylase
25	CYP19	Umsetzung von Steroiden zu Östrogenen; Aromatase
	CYP27	Cholesterol-27-hydroxylase

30 Die P450-Enzyme der Enzymfamilien CYP1-3 sind hauptverantwortlich für die Metabolisierung xenobiotischer Stoffe; die dabei auftretenden oxidativen Reaktionen sind im folgenden unterteilt in C-, S-, N-Oxidation, Dealkylierung und Dehalogenierung.

35 a) C-Oxidationen

P450-Enzyme hydroxylieren oder epoxidieren nichtaktivierte C-H-Bindungen und/oder C=C-Doppelbindungen in aliphatischen und aromatischen Systemen. Die gebildeten Metabolite sind häufig toxisch, wie das Nervengift 2,5-Hexandion oder karzinogen wie  
40 DNA-alkylierende Epoxide (z. B. Styroloxid). Ferner wirken durch P450-Enzyme C-oxidierte Nitrosamine und Benzpyrene karzinogen.

Arzneimittel, wie Barbiturate und Phenobarbitale, werden ebenfalls durch P450-Enzyme in ihre Wirkform überführt. Die  
45 Hydroxylierung nicht aktivierter -C-H Bindungen ist wegen der seltenen Konkurrenz durch chemische Verfahren eine der nützlichsten Biotransformationsreaktionen. Im Gegensatz zu

Radikalreaktionen zeigen Bio-Hydroxylierungsreaktionen an C-Atomen folgende Aktivitätsreihe: sekundär> tertiär> primär. Bekannte industriell durchgeführte Verfahren sind die Progesteron-Hydroxylierung an 11 $\alpha$ -Position mittels *Aspergillus*

- 5 *niger*, die etwa die Hälfte der 37 konventionellen Schritte erübrigte, und die 7 $\beta$ -Hydroxylierung von 3 $\alpha$ -Hydroxy-5 $\beta$ -cholsäure durch *Fusarium equiseti*. Das Produkt Ursodesoxycholsäure vermag Cholesterin aufzulösen und wird in der Behandlung von Gallensteinen eingesetzt. In der asymmetrischen Synthese werden
- 10 Biotransformationen unter anderem zur Synthese von  $\beta$ -Hydroxybuttersäure, einem Ausgangsmaterial für Vitamin-synthesen ( $\alpha$ -Tocopherol), von Geschmacksstoffen, von Antibiotika (Calcimycin) und von chiralen verzweigten epoxidierten Alkenen verwendet.

15

b) N-Oxidation / S-Oxidation

P450-Enzyme hydroxylieren Aryl- und Acetylamine wie Benzidin, 4-Biphenylamin und 2-Acetaminofluoren und vergleichbare

- 20 Heterozyklen, die beim Anbrennen von Nahrungsmitteln entstehen, am N-Atom. Nach weiterer Acetylierung oder Sulfonierung der Hydroxygruppen entstehen elektrophile, stark karzinogen wirkende Substanzen.
- 25 Aryl- und Alkylthioether werden durch P450-Monooxygenasen direkt am S-Atom zu Sulfoxiden oxidiert. Die Oxidation bleibt jedoch häufig nicht auf der Stufe des Sulfoxids stehen; viele Sulfoxide werden zu den entsprechenden Sulfonverbindungen weiteroxidiert, die häufig zelltoxisch wirken. Mikrobielle Oxidationen von
- 30 chiralen Dithioacetalen gelingen mit hohem Enantiomerenüberschuß mit *Corynebacterium equi* und *Helminthosporium sp.*

c) Oxidative Dealkylierungen

- 35 P450-Enzyme katalysieren auch die oxidative O-, N- und S-Dealkylierung. Beispiele dieser wichtigen Reaktionen sind die O-Dealkylierung von Codein, Mescaline, Phenacetin, die N-Dealkylierung von Ephedrin, Methamphetamin, Aminopurin und die S-Dealkylierung von 6-Methylthiopurin zu 6-Methylpurin.

40

d) Oxidative Deaminierung

P450-Enzyme katalysieren auch die oxidative Deaminierung von Aminen. Diese Reaktion hat primär eine Entgiftungsfunktion für

- 45 den Organismus. Histamin, Noradrenalin und Mescaline können unter anderem auf diese Weise deaminiert werden.

## e) Oxidative Dehalogenierung

Viele halogenierte Alkane und Alkene bilden nach Hydroxylierung an einer -C-H Bindung ein instabiles Intermediat, das in ein Aldehyd oder Keton und H-Hal dissoziiert. Beispiele sind die Oxidation von Ethylendibromid zu 2-Bromacetaldehyd und die Oxidation von Chloroform zu Phosgen. Mono- und dihalogeniertes Methan bildet im Vergleich zu dreifach halogeniertem Chloroform nur schwach zelltoxische Metabolite.

10

Eine mechanistische Beschreibung der vorgestellten P450-Reaktionstypen findet sich in dem Übersichtsartikel von Koymans et al., in *Xenobiotica*, (1993) 23(6):633.

15 In vivo / in vitro Nutzung von P450-Monooxygenasen zur Feinchemikaliensynthese:

Im Gegensatz zur mikrobiellen Biotransformation beschränkt sich die Verwendung rekombinant exprimierter P450-Monooxygenasen zur

- 20 Feinchemikaliensynthese trotz enormer Potentiale auf wenige *in vivo* Verfahren wie die Herstellung von Dicarbonsäuren als Zwischenstufen für Geruchsstoffe, Steroiden wie Progesteron und subterminal hydroxylierter gesättigter und ungesättigter Fettsäuren als Vorstufen für Riechstoffe (Laktone), Polymere und
- 25 Darreichungsformen für Medikamente.

Die Verwendung von P450 Monooxygenaseenzymen *in vitro* zur Feinchemikaliensynthese ist bisher noch nicht literaturbekannt. Um P450-Monooxygenasen zur Feinchemikaliensynthese zu verwenden,

- 30 müssen Expressionssysteme vorhanden sein, die es erlauben, funktionell aktives P450 über Artgrenzen hinweg in hohen Ausbeuten zu exprimieren. Ferner muß das Enzym eine ausreichend hohe Aktivität und Stabilität (Temperaturstabilität, Lösungsmittelstabilität, Oxidationsstabilität) besitzen. Die
- 35 produzierten Metabolite sollten für das Protein und den Wirt nicht toxisch sein. Für Klasse I und Klasse II sollte ferner ein geeignetes Cofaktor-Recyclingsystem vorhanden sein. Die vorliegende Erfindung schafft hierzu die Voraussetzungen.

40 Das P450 BM-3 Monooxygenasesystem:

P450 BM-3 (CYP102) wurde erstmals im Jahre 1986 als dritte P450-Monooxygenase aus *Bacillus megaterium* in *E. coli* funktionell aktiv exprimiert und charakterisiert. Mit einem Molekulargewicht

45 von 118 kDa war P450 BM-3 das erste bekannte wasserlösliche natürliche Fusionsprotein, das alle drei Domänen (FAD, FMN, P450) in einer einzigen Polypeptidkette enthält. Im Jahre 1993 gelang

es, die P450-Domäne ohne Substrate (Ravichandran et al., Science (1993) 261, 731) und im Jahre 1997 mit Substrat (Li et al. Nature Structural Biology (1997), 4(2): 140) zu kristallisieren. P450 BM-3 dient aufgrund seiner Sequenzhomologie zu eukaryontischen P450 und mangels eukaryontischer P450-Kristallstrukturen als bevorzugtes Strukturmodell für diese P450-Enzyme.

P450 BM-3 ist eine Fettsäurehydroxylase, die Carbonsäuren, Alkohole, Amide, Alkylammoniumverbindungen ab Kettenlänge C12 bis zu C22 subterminal hydroxyliert. Die Regiospezifität der Hydroxylierung hängt, wie in Tabelle 2 gezeigt, stark von der Kettenlänge der Fettsäure ab.

15 Tabelle 2

Substrate	$\omega$ -Hydroxylierung [%]	$\omega$ -1 Hydroxylierung [%]	$\omega$ -2 Hydroxylierung [%]	$\omega$ -3 Hydroxylierung [%]
20 Laurinsäure (12:0)	-	48	26	26
Myristinsäure (14:0)	-	58	21	21
25 Palmitinsäure (16:0)	-	20	48	31

Die Erfindung wird nun unter Bezugnahme auf die beiliegenden Figuren und die folgenden Ausführungsbeispiele, welche die Anwendung des erfindungsgemäßen Donorsystems auf die Hydroxylierung von Fettsäuren mit Hilfe von P450 Enzymen betreffen, näher erläutert. Dabei zeigt

Figur 1 das P450 BM3-Klonierungsschema am Beispiel von pCYTEXP1;

35 Figur 2 das Prinzip des erfindungsgemäßen spektroskopischen P450-Nachweises;

Figur 3 das Absorptionsspektrum für die Reduktion von Cobalt(III)sepulchrat mit Zn-Pulver in Tris/HCl, 0,2 M, pH 8,2; gepunktete Linie Co(III)sepulchrat oxidiert; durchgezogene Linie Zn/Co(III)sepulchrat reduziert;

Figur 4 die Absorptionsänderung bei Umsatz von 12-pNCA durch P450 BM-3 F87A mit Zn/Co(III)sepulchrat in Tris/HCl, 50 mM, pH 8,2, 0,25 M KCl;

- Figur 5 eine Skizze des Elektronentransferwegs von Zn/Co(III)sepulchrat auf P450 mit "shunt"-Reaktionsweg und pNCA als Substrat;
- 5 Figur 6 den Umsatz von 12-PCA durch P450 BM-3 F87A und Zn/Co(III)sepulchrat in Tris/HCl, 50 mM, pH 8,2, 0,25 M KCl mit und ohne Zugabe von Katalase;
- 10 Figur 7 den Einfluß der Tris/HCl- und Kaliumphosphat-Puffermischung auf die Reduktion von p-Nitrophenolat in Gegenwart von P450 BM-3 F87A und Zn/Co(III)sepulchrat;
- 15 Figur 8 (A) 12-pNCA Umsatz durch P450 BM-3 F87A als Funktion der Co(III)sepulchrat-Konzentration; (B) den Einfluß von Co(III)sepulchrat auf die Aktivität von P450 BM-3 F87A in Gegenwart von Substrat;
- 20 Figur 9 den 12-pNCA Umsatz als Funktion der eingesetzten Zinkpulvermenge in Gegenwart von 0,5 mM Co(III)sepulchrat;
- Figur 10 die P450 BM-3 F87A Restaktivität nach 5 min Inkubation bei verschiedenen Wasserstoffperoxidkonzentrationen ohne Substrat.

## 25 Referenzbeispiel 1: Mikrobiologische Methoden

### 1. Mikroorganismen und Plasmide, Chemikalien und Enzyme

- Das Bakterium *Bacillus megaterium* wurde bei DSMZ-Stammsammlung  
30 (32<sup>T</sup>, Braunschweig, Deutschland), die *E.coli*-Stämme DH5 $\alpha$ , JM105 und JM109 bei Clontech (Heidelberg, Deutschland) und XL1-Blue bei Stratagene (Heidelberg, Deutschland) erworben. Den Stamm W3110 erhielten wir vom Institut für Bioverfahrenstechnik (Stuttgart, Deutschland). Der *E.coli*-Stamm DH5 $\alpha$  (supE44, lacU169 [80lacZ M15]  
35 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1) wurde, sofern nicht anders erwähnt, für die folgenden beschriebenen Klonierungsarbeiten verwendet. Als Plasmide fanden pCYTEXP1 mit dem temperaturinduzierbaren P<sub>R</sub>P<sub>L</sub>-Promotorsystem des Bakteriophagen  $\lambda$  (Belev T.N., et al., Plasmid (1991) 26:147) und pASK-IBA1CA mit Tetrazyklin-Pro-  
40 motor (Schmidt, T.G.M., et al., J. Chromatogr. A (1994) 676:337; Schmidt, T.G.M. et al., J.Mol.Biol. (1996) 255:753) Verwendung. Die im Rahmen dieser Arbeit zur heterologen Expression von P450 BM-3 verwendeten Stämme und Plasmide sind in Tabelle 3 zusammengefasst, wobei pT die Herkunft der P450 BM-3 Konstrukte vom pCY-  
45 TEXP1-Plasmid und pA die Herkunft vom pASK-IBA1CA-Plasmid kennzeichnet.

Tabelle 3

	E.coli-Stamm/Plasmid-Insert-Konstrukt	exprimiertes Protein
5	DH5 $\alpha$ /pT-USC0BM3, W3110/pT-USC0BM3	P450 BM-3
	DH5 $\alpha$ /pT-USC1BM3, JM105/pT-USC1BM3, JM109/pT-USC1BM3, W3110/pT-USC1BM3	P450 BM-3His <sub>6</sub>
10	DH5 $\alpha$ /pT-USC1BM3F87A, JM105/pT-USC1BM3F87A, JM109/pT-USC1BM3F87A, W3110/pT-USC1BM3F87A XL1-Blue/pT-USC1BM3F87A	P450 BM-3His <sub>6</sub> F87A Mutante
	DH5 $\alpha$ /pT-USC2BM3, W3110/pT-USC2BM3	P450 BM-3Glu <sub>6</sub>
	DH5 $\alpha$ /pT-USC3BM3, W3110/pT-USC3MB3	P450 BM-3Arg <sub>6</sub>
15	DH5 $\alpha$ /pA-USC4BM3, JM105/pA-USC4BM3, JM109/pA-USC4BM3, W3110/pA-USC4BM3	P450 BM-3Strep

Sofern nichts anderes erwähnt ist, wurden alle Chemikalien von Fluka Chemie (Buchs, Schweiz) und alle Enzyme von New England Biolabs (Beverly, USA) oder Boehringer Mannheim (Penzberg, Deutschland) bezogen.

## 2. Kulturmedien

25 Alle Komplexmedien stammen von Difco (Augsburg, Deutschland).

### a) Nutrient-Medium (Vollmedium für *Bacillus megaterium*)

	Peptone	5,0 g
	Bacto beef	3,0 g
30	Bacto peptone	5,0 g
	Agar	15 g (nur für Plattenkultur)
	MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	10 mg
	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

### 35 Glycerinkultur

Glycerin (86 %)	500 $\mu$ l
Kultur(OD <sub>578</sub> = 1,0)	500 $\mu$ l

### b) Luria-Bertani-Amp (LB-Amp, Vollmedium für *E. coli*)

40	Tryptone	10,0 g
	NaCl	5,0 g
	Yeast extract	5,0 g
	Agar	20,0 g (nur für Plattenkultur)
	Ampicillin	100 g/ml
45	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

3. Kultivierung der *E. coli*-Stämme und von *Bacillus megaterium*

## a) Schüttelkolbenversuche

5 Die Kultivierung von *Bacillus megaterium* erfolgte im  
Nutrient-Medium bei 30°C, die rekombinanten *E. coli*-Stämme  
(DH5α, JM105, JM109, XL1-Blue, W3110) wurden in LB-Amp  
Medium bei 37°C kultiviert. Dazu wurde jeweils eine Kolonie  
10 mittels Impföse von einer Agarplatte in 5 ml LB-Amp  
überführt. Nach ca. 18 h Stunden Kultivierung bei 30°C  
(*Bacillus megaterium*) und 37°C (*E. coli*) bei einer  
Schüttelfrequenz von 220 Upm wurden 400 ml Medium in einem  
2-l-Kolben mit 4 ml Kultur inokuliert. Die Induktion der  
P450-Expression in *E. coli* erfolgte nach Erreichen eines  
15 OD<sub>578</sub>-Wertes zwischen 0,8 und 1,0 durch eine drei- bis  
vierstündige Hitzeschockinduktion bei 42°C im Falles der  
pT-Plasmid-Konstrukte oder durch Zugabe von  
Anhydrotetracyclin (Endkonzentration 0,4 mg/l) beim  
20 pA-USC4BM3-Plasmid und einer 14 stündigen Inkubation bei  
30°C.

## b) 30-l-Batch-Fermentationen

25 Zur präparativen P450 BM-3 Produktion wurde die  
Expressionskassette pT-USC1BM3, der Wirt DH5α und ein  
Bioengineering Fermenter Typ LP351 bei einer Belüftung von  
3,5 l/min, einer Rührgeschwindigkeit von 300 Upm bei 37°C in  
LB-Amp-Medium bei einem Start-pH-Wert von 7,5 eingesetzt. Um  
30 Schaumbildung zu vermeiden und Ausbeuten zu steigern wurden  
2,0 ml steriles Contraspum 210 (ZSchimmer & Schwarz,  
Lahnstein, Deutschland) und 0,1 mg/l FeCl<sub>3</sub> vor Inokulation  
dem LB-Amp-Medium zugegeben (Nishihara et al. 1997).  
Inokuliert wurde durch Zugabe zweier 400 ml  
35 Schüttelkolben-Kulturen (OD<sub>578</sub>= 0,8-1,0; Abschnitt a)). Nach  
Erreichen eines OD<sub>578</sub>-Wertes von 1,0 im Fermenter erfolgte die  
P450-Produktion mittels Hitzeschockinduktion durch Erhöhen  
der Temperatur für drei bis fünf Stunden von 37°C auf 42°C.  
P450 BM-3 oder die Mutante F87A wurden in *E. coli* DH5α in  
40 Ausbeuten von 36 bis 48 mg/l Fermenterbrühe exprimiert. Die  
Aufkonzentrierung der *E. coli* Kultur von 30 Liter auf 2  
Liter wurde durch Querstromfiltration mit einer Millipore  
Applikation (Eschborn, Deutschland) mit einer Filtron  
(Dreieich, Deutschland) Centrasette OMEGA (0.3 µm) Membran  
45 durchgeführt. Nach Zentrifugation bei 9200 g für 20 min  
wurden die Zellen in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,5)  
oder Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,5) resuspendiert, in zwölf



50 ml Falcon-Tubes (Greiner) aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

## Referenzbeispiel 2: Synthetische Oligonukleotide

5

Alle Primer wurden von ARK Scientific GmbH Biosystems (Düsseldorf, Deutschland) hergestellt. Nur die Primer für die Punktmutation und für die Isolierung des P450<sub>BM-3</sub> Gens aus der genomischen *Bacillus megaterium* DNA waren HPLC gereinigt.

10

a) Oligonukleotide für genomische *Bacillus megaterium*-DNA

B1) 5'-GTGAAAGAGGGATCCCATGACAATTAAAGAAATGCC-3'  
(SEQ ID NO: 1)

15 B2) 5' -GCCTCTTGGATCCTTACCCAGCCCACACGTCTTTTGCG-3'  
(SEQ ID NO: 2)

**b) Primer für Sequenzierung**

20	R0_5	5'-GTACGTGATTTTGCAGGAG-3' (SEQ ID NO: 3)
	R1	5'-GGCTATCATGCGATGATGGT-3' (SEQ ID NO: 4)
	R1_5	5'-CCCAGCTTATGATGAAAC-3' (SEQ ID NO: 5)
	R2	5'-GGAAAAGATCCAGAAACGGG-3' (SEQ ID NO: 6)
	R2_5	5'-GTCGGCATGGTCTTAAACG-3' (SEQ ID NO: 7)
25	R3	5'-ATTCTCAGCTTCACCGTGA-3' (SEQ ID NO: 8)
	R3_5	5'-CTTGGCGGTATTCCTTCAC-3' (SEQ ID NO: 9)
	R4	5'-ATTTGCACCGCAGGTCGCAA-3' (SEQ ID NO: 10)
	R4_5	5'-CTGGGCTACTACGTATC-3' (SEQ ID NO: 11)
	R5	5'-TTCAATTTGTGACAGCGCC-3' (SEQ ID NO: 12)
30	R5_5	5'-GAAGGAGATCATTTAGGTG-3' (SEQ ID NO: 13)
	R6	5'-TCGCGCAATGGCTGCTAAAA-3' (SEQ ID NO: 14)
	R6_5	5'-CGATTTCTTCATCACCTC-3' (SEQ ID NO: 15)
	R7	5'-CTGCCAAAAGACCCTGAAAC-3' (SEQ ID NO: 16)
	L1	5'-ACCATCATCGCATGATAGCC-3' (SEQ ID NO: 17)
35	L2	5'-CCCGTTTCTGGATCTTTTCC-3' (SEQ ID NO: 18)
	L3	5'-TCACGGTGAAGCTGAGGAAT-3' (SEQ ID NO: 19)
	L4	5'-TTGCGACCTGCGGTGCAAAT-3' (SEQ ID NO: 20)
	L5	5'-GGCGCTGTCGACAAATTGAA-3' (SEQ ID NO: 21)
	L6	5'-TTTTAGCAGCCATTGCGCGA-3' (SEQ ID NO: 22)
40	L7	5'-GTTTCAGGGTCTTTTGGCAG-3' (SEQ ID NO: 23)

c) Oligonukleotide für Tags am C-Terminus

45 A1) 5'-GTGAAAGAGGGATCCCATGACAATTAAAGAAATGCC-3'  
(SEQ ID NO: 24)  
A2) 5'-CGGAATTCTTAACGACGACGACGACGACGCCAGCCACACG-3'  
(SEQ ID NO: 25)

- G1) 5'-GTGAAAGAGGGATCCCATGACAATTAAAGAAATGCC-3'  
(SEQ ID NO: 26)
- G2) 5'-CGGAATTCTTATTCTTCTTCTTCTTCTTCCCCAGCCCACACG-3'  
(SEQ ID NO: 27)
- 5 H1) 5'-GTGAAAGAGGGATCCCATGACAATTAAAGAAATGCC-3'  
(SEQ ID NO: 28)
- H2) 5'-CGCAATTCTTAATGATGATGATGATGATGCCAGCCCACACG-3'  
(SEQ ID NO: 29)
- S1) 5'-GTCTCAGCGTGAGACCCCCAGCCCACACGTCTTTTGCC-3'  
(SEQ ID NO: 30)
- 10 S2) 5'-GTGAAAGAGGTCTCCAATGACAATTAAAGAAATGCC-3'  
(SEQ ID NO: 31)

d) Primer für P450 BM-3 Punktmutante F87A

- 15 F87A1 5'-GCAGGAGACGGGTGGCCACAAGCTGGACGCATG-3'  
(SEQ ID NO: 32)
- F87A2 5'-CATGCGTCCAGCTTGTGGCCAACCCGTCTCCTGC-3'  
(SEQ ID NO: 33)

20

### Referenzbeispiel 3: Gentechnische Methoden

#### 1. Isolierung und Präzipitation genomischer *Bacillus*-DNA und Plasmid-DNA aus *E. coli*

25

- Zur Isolation der genomischen DNA aus *Bacillus megaterium* mittels Phenol-Chloroformextraktion wurde das Zellpellet aus 200 ml Kulturüberstand (OD<sub>578</sub> = 1,2) in 20 ml Lysozymmix (18 mg Lysozym, 50 mM EDTA, 50 mM NaCl, 30 mM Tris/HCl, pH 8,0) resuspendiert und
- 30 bei 37°C und 30 Minuten lang bei 220 UpM geschüttelt. Nach Zugabe von 2 ml SDS (10 % (m/v)) wurde weitere 60 Minuten bei 37°C und 220 UpM inkubiert. Zur Entfernung von Zelltrümmern wurde dreimal mit einer Mischung aus Chloroform/Isoamylalkohol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) und einmal mit Phenol extrahiert. Die
- 35 genomische DNA wird durch Zugabe von 10 % (v/v) 3 M NaAc, pH 4,8 und 60 % (v/v) Isopropanol gefällt, mittels Glasstab aufgerollt, in ein Corex-Röhrchen überführt und bei 32 570 g zentrifugiert. Nach dreimaligem Waschen mit 70 % Ethanol wird die DNA am
- 40 "Hausvakuum" getrocknet und in 3 ml TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) gelöst. Die Reinheit der DNA wurde spektroskopisch durch Quotientenbildung von 260 nm zu 280 nm zu 2,2 bestimmt.

45

Die Isolation der Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem auf alkalischer Lyse der Zellen basierenden QIAprep-Spin-Miniprep-Kit exakt nach den Angaben des Herstellers (Qiagen).

5

## 2. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

- a) PCR zur Isolierung des P450 BM-3 Gens aus genomischer *Bacillus megaterium*-DNA

10

### PCR-Standardprotokoll

15

20

Wiederholungen des Programmschritt s	Denaturierung	DNA_Annealing	Elongation/DNA- Synthese
1 Mal	95°C, 7 min		
30 Mal	95°C, 1,5 min	50°C, 1,5 min	72°C, 2 min
1 Mal			72°C, 7 min

### Standard-Ansatz

25

8 µl dNTP-Mix (200µM), 10 µl Taq-Polymerase-Puffer (10 x) ohne MgCl<sub>2</sub>, 8µl MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1 µl Primer B1 (0,1 µM), 1 µl Primer B2 (0,1 µM), 1µl genomische *Bacillus megaterium*-DNA, 2,5 U Taq-Polymerase (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen), ad 100 µl demineralisiertes Wasser.

30

- b) Einfügen von Tag-Sequenzen am C-Terminus

35

40

Um die Proteinreinigung zu vereinfachen und eine gerichtete Immobilisierung von P450 BM-3 zu ermöglichen wurde ein jeweils sechs Aminosäuren langer C-terminaler-Tag an das P450 BM-3 Gen angefügt. Als Templat fungierte genomische *Bacillus megaterium*-DNA. Als überhängende Restriktionsenden wurden für die His-, Arg- und Glu-Tags *Bam*HI und *Eco*RI gewählt, um anschließend die modifizierten P450-BM-3-Gene in das Plasmid pCYTEXP1 zu klonieren. Für den Strep-Tag wurden für das 5'- und 3'-Ende *Bsa*I gewählt; dies ermöglicht eine Klonierung in das Plasmid pASK-IBA1CA. *Bsa*I schneidet erst nach der Erkennungssequenz, wodurch die überhängenden Restriktionsenden eine unterschiedliche Sequenz aufweisen und somit eine gerichtete Ligation erlauben.

45

Für die PCR wurden das Standard-PCR Programm und der Standard-Ansatz verwendet. Im Unterschied zum Standard-Ansatz wurden für den His<sub>6</sub>-Tag die Primer H1 und H2, für den Arg<sub>6</sub>-Tag die Primer A1 und A2, für den Glu<sub>6</sub>-Tag die Primer G1 und G2 sowie für den Strep-Tag die Primer S1 und S2 verwendet.

### 3. Restriktionsspaltung, Elektrophoretische Trennung und Reinigung von DNA-Fragmenten

- 10 Restriktionsendonukleasen schneiden DNA sequenzspezifisch. Die Restriktionsspaltung von DNA erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 10 µl in Gegenwart von 2-3 µl DNA (Spin-Präp (Qiagen)), 1-2 U Restriktionsenzym, 1 µl Restriktionspuffer (10x) und ad 10 µl ddH<sub>2</sub>O durch ein- bis zweistündige Inkubation der Reaktionslösung
- 15 bei 37°C (außer BsaI) entsprechend der Herstellervorschrift. Die Reinigung der DNA-Fragmente wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese nach der Vorschrift von Sambrook et al. 1989 durchgeführt. Abhängig von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden 0,8-2%ige Agarosegele verwendet. Als
- 20 Elektrophorese-Puffer diente TAE-Puffer (40 mM Tris/HCl, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA, pH 8,3). Angelegt wurde aufgrund der Wärmeentwicklung bei bis zu einprozentigen Agarose-Gelen eine Spannung von 120 V und bei bis zu zweiprozentigen Agarose-Gelen von 100 V. Interkalierendes Ethidiumbromid (Endkonzentration
- 25 0,25µM) wurde zur Visualisierung der DNA im UV-Durchlicht eines Transilluminators (312 nm) verwendet.

- Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde unter Verwendung des QIAquick Gel Extraktion Kits (Qiagen)
- 30 durchgeführt. Dabei wird die DNA durch Binden an eine Silika-Gel enthaltene Säule immobilisiert und mittels verschiedener Waschschriffe von Verunreinigungen befreit. Durch anschließende Elution mit demineralisiertem Wasser können mit dieser Methode bis zu 8 µg DNA (100 bp-10 kb) erhalten werden.

35

### 4. Ligation und Transformation in *E. coli*

- Zur Ligation von DNA wurde die T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Beverly, USA) verwendet, die die Bildung von
- 40 Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxy-Enden der DNA katalysiert und somit zwei lineare DNA-Moleküle verbindet oder die Zyklisierung eines linearen Moleküls ermöglicht.

- 45 Zur Ligation wurden Agarose-Gel gereinigte Vektor- und Insertfragmente (vergleiche Punkt 3.) im molaren Verhältnis 1 zu 3 bis 1 zu 5 zugunsten des Inserts in ein Eppendorf-Reaktionsge-

fäß gegeben. Vor Zugabe von 2 µl Ligase-Puffer (10x) und 2-10 U T4-DNA-Ligase wurde demineralisiertes Wasser hinzugefügt (Gesamtvolumen 20 µl). Die Reaktionsansätze wurden eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 7°C inkubiert.

5

Zur Herstellung kompetenter Zellen für die Transformation wurden 500 µl einer *E. coli*-Übernachtskultur zum Animpfen eines 250 ml-Schüttelkolbens, der 50 ml LB-Medium enthielt, verwendet. Nach ca. dreistündiger Inkubation bei 37°C und 220 UpM, wird die

- 10 Kultur nach Erreichen eines OD<sub>600</sub>-Wertes bei 0,4-0,6 bei 5500 g 3 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 2 ml TSS-Puffer (10 g PEG6000, 5 ml DMSO, 0,6 g MgSO<sub>4</sub>, ad 100 ml LB) resuspendiert, auf Eis inkubiert und in 200 µl Aliquots aufgeteilt und nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei
- 15 -80°C gelagert.

Zur Transformation werden zu 200 µl der kompetenten Zellen 5 bis 15 µl des Ligationsansatzes gegeben. Nach 30minütiger Inkubation

- 20 auf Eis wird der Transformationsansatz 30 s bei 42°C im Thermomixer inkubiert und 800 µl auf 37°C erwärmtes LB-Medium zugegeben. Die Ansätze werden eine Stunde lang im Inkubator bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden anschließend bei 5500 g zentrifugiert (3 Minuten), im rücklaufenden Tropfen LB-Medium
- 25 aufgenommen und auf LB-Amp-Agarplatten ausplattiert. Über Nacht wurden die Agarplatten bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

#### 5. DNA-Sequenzierung

- 30 Die DNA-Sequenzierung wurde unter Verwendung des Applied Biosystems DNA Sequenzierautomats 373A und des Dye Terminator Cycle Sequencing-Kits mit AmpliTaq-DNA-Polymerase durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgt nach der Didesoxy-Methode von Sanger, jedoch werden statt radioaktiv markierter dNTPs, dNTPs mit
- 35 Fluoreszenzmarkern eingesetzt, die im Verlauf der Sequenzierreaktion in die synthetisierten DNA-Fragmente eingebaut werden.

- Die Reaktionsprodukte wurden anschließend mit 100 prozentigem auf
- 40 -20°C gekühltem Ethanol gefällt. Nach Trocknung der DNA und Aufnahme in 4 µl einer 5:1-Mischung aus Formamid und 25 mM EDTA, pH 8,0 erfolgte die Denaturierung eines jeden PCR-Ansatzes bei 95°C für 5 Minuten und sofortiger Überführung der Proben auf Eis.

- 45 Die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten DNA-Fragmente durchlaufen während der Gelelektrophorese einen Laserstrahl. Das senkrecht zu diesem Strahl emittierte Fluoreszenzlicht wird von

Fotodioden hinter dem Gel gemessen und von der Software in ein Kurvendiagramm umgewandelt.

#### Sequenzier-Ansatz

5

8 µl Terminator Ready Reaction Mix; 3,2 pmol Primer; 300-500 ng Template DNA;  
H<sub>2</sub>O ad 20 µl.

10

#### PCR-Programm

15

Wiederholungen des Programmschritt s	Denaturierung	DNA-Annealing	Elongation/DNA- Synthese
1 Mal	96°C, 6 min		
25 Mal	96°C, 40 s	50°C, 30 s	60°C, 4 min
1 Mal			60°C, 4 min

20

#### Sequenzier-Gel-Zusammensetzung:

Barnstoff 30 g (Roth); Rotiphorese NF-10x-TBE-Puffer 6 ml (Roth); Acrylamid/Bis-Lösung 40 % (29:1) 9 ml (Roth); ddH<sub>2</sub>O demineralisiert 23,5 ml.

25

Die fertige Lösung wird filtriert und entgast. Die Polymerisation wird durch Zugabe von 24 µl TEMED und 180 µl 10 % (m/v) APS gestartet. Für Einzelheiten dazu, zur Auswertung der Sequenzdaten und zu den dNTP-Markierungen, sei auf das Handbuch zum Sequenzierautomaten verwiesen.

30

#### 6. Punktmutation F87A mittels QuikChange Kit (Stratagene)

Zur Erhöhung des Sensitivität des pNCA-Assaysystems, wurde an Position 87 die Aminosäure Phenylalanin durch ein Alanin ersetzt. Um die Punktmutante leichter identifizieren zu können, wurde, ohne weitere Änderung der Aminosäuresequenz, eine zusätzliche EaeI-Restriktionsschnittstelle unter Einbeziehung der Mutationsposition, eingefügt.

40

Im Gegensatz zum Standard-PCR-Programm erfolgte hierbei nur eine vierminütige DNA-Denaturierung und der Sequenzierreaktionsschritt wurde bei einer Annealing-Temperatur von 52,3°C, und 17-minütigem Elongationsschritt nur 16 Mal durchlaufen. Auf den dritten Programmschritt wurde verzichtet.

45

## Ansatz für PCR:

1,2 µl dNTP-Mix (200µM), 5 µl Pfu-Polymerase-Puffer (10x), 2,5 U Pfu-Polymerase, 2,5 µl Primer F87A1 (5nM), 2,5 µl Primer F87A2  
5 (5nM), 1 µl pT-USC1BM3 (aus Mini-Präparation 1:20 mit demineralisiertem Wasser verdünnt), ad 50 µl demineralisiertes Wasser.

10 Die "Annealing"-Temperatur von 52,3°C zeigte nach obiger PCR auf einem einprozentigen Agarose-Gel eine scharfe Bande mit erwarteter Fragmentgröße.

15 Nach Abtrennen des Mineralöls vom Reaktionsgemisch wurde der PCR-Ansatz mit 1µl DpnI (10 U/µl) versetzt und die Lösung vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Es wurde kurz zentrifugiert und inkubiert bei 37°C für eine Stunde. Während des Verdaus wurden die ultrakompetenten *E. coli* XL1-Blue auf Eis aufgetaut und in 50 µl Aliquots auf 15 ml Falcon-Tubes verteilt.  
20 Nach Zugabe von 1 µl β-Mercaptoethanol, 4 µl des verdauten PCR-Reaktionsansatzes und 30minütiger Inkubation auf Eis folgte ein 30 s langer Hitzeschock bei 42°C und eine zweiminütige Abkühlung auf Eis. Zum Transformationsansatz wurden 450 µl erwärmtes (Ölbadtemperatur 42°C) NZY-Medium (12 g NZamine, 5 g  
25 Hefeextrakt, 5 g NaCl, pH 7,5) zugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C und 220 UpM und Zentrifugation (5500 g, 3 min) wurde das Zellpellet in der Restflüssigkeit resuspendiert und auf LB-Amp-Platten ausgestrichen.

## 30 Referenzbeispiel 4: Präparative Methoden

1. Zellaufschluß

Zellpellets mit einer Biofeuchtmasse von bis zu 15 g *E. coli*  
35 DH5α/pT-USC1BM-3 oder DH5α/pT-USC1BM-3F87A wurden auf Eis aufgetaut und in 25 ml Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 7,5, 1 mM EDTA) oder Tris/HCl Puffer (50 mM, pH 7,5, 1 mM EDTA) suspendiert. Mittels dreiminütiger Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier W250, (Dietzenbach, Deutschland), Leistungsabgabe 80 W,  
40 Arbeitsintervall 20 %) wurde die auf Eis gekühlte *E. coli*-Zellsuspension aufgeschlossen. Vor der Proteinreinigung wurde die Zellsuspension für 20 min bei 32 500 g zentrifugiert und durch einen 0,22 µm Sterivex-GP-Filter (Millipore) filtriert. Diese klare Lösung wird im folgenden als Rohextrakt bezeichnet.

## 2. Chromatographische P450 BM-3-Reinigung mittels Anionenaustauschern

Zur Proteinreinigung wurde ein ÄKTAexplorer System (Amersham Pharmacia Biotech) mit einer auf Personal-Computern basierenden OS/2-UNICORN Steuersoftware v2.1 und einem Frac-900 Fraktionssammler verwendet, das die gleichzeitige Messung der Gesamtproteinelution bei 280 nm und P450 BM-3 Elution bei 417 nm erlaubt.

10

Alle analytischen P450 BM-3 Proteinreinigungen mittels Anionenaustauscherchromatographie wurden bei 200 cm/h, Raumtemperatur und einer Beladung von 6-10 mg P450 BM-3 pro 100 ml Matrix durchgeführt. Alle Chromatographiematerialien wurden von Tosoh (Stuttgart, Deutschland) bezogen.

### a) Packung und Charakterisierung der Chromatographiesäulen

Zur Entwicklung eines P450 BM-3 Reinigungsprotokolls wurden vom Hersteller gepackte MPD-DEAE 650S (7,5 mm x 85 mm, Partikeldurchmesser 35 µm, Af=1,1, 4100 TP/m) und selbst gepackte XK16/20 (16 mm x 100 mm, APB) Chromatographiesäulen verwendet, die Toyopearl DEAE 650M (Af= 1,1, 1610 Tp/m), SuperQ 650M, (Af= 1,2, 1840 Tp/m) und QAE 550M (Af= 1,0, 1780 Tp/m) mit einem Partikeldurchmesser von 65 µm enthielten. Für die präparativen Chromatographiereinigungen wurde eine INDEX200 (APB) Glassäule (20 cm x 19 cm, Af= 1,4, 3800 Tp/m), sechs Liter Toyopearl DEAE 650M und eine Zahnradpumpe (ISMATEC, PB, USA) benutzt. Im Gegensatz zu den analytischen P450 BM-3 Chromatographiereinigungen wurde das ÄKTAexplorer System über einen 1/20 aufgeteilten Fluß als Monitor verwendet, und die Puffer vor den präparativen Reinigungen manuell hergestellt. Die Puffer bestanden aus Tris/HCl (0,1 M, pH 7,8) mit 1 mM EDTA sowie 150 mM NaCl für die erste, 250 mM NaCl für die zweite und 1 M NaCl für die dritte Salzstufe.

### b) Wahl der pH-, Elutions- und Pufferbedingungen

Voruntersuchungen auf der Grundlage von Aktivitätsmessungen über NADPH-Verbrauch ergaben einen geeigneten pH-Bereich zwischen 6,8 und 8,0 zur P450 BM-3 Reinigung. Spätere Untersuchungen zur pH-Stabilität mit dem pNCA-Nachweissystem bestätigten diesen pH-Bereich.

Anionenaustauscherchromatographien mit linearen NaCl-Gradienten zeigten, daß ein Tris/HCl-Puffer (0,1 M, pH 7,8) mit 1 mM EDTA einem Phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,0 bis pH 7,5) mit 1 mM EDTA in Bezug auf Bindungskapazität und Auflösungsvermögen für P450 BM-3



deutlich überlegen ist. Aus diesen Gründen wurde das Tris/HCl-Puffersystem für alle weiteren Reinigungsoptimierungen verwendet.

### 5 3. Immobilisierung der P450 BM-3 F87A Mutante

#### a) Vorexperimente zur Auswahl der Trägermaterialien

10 Zur Immobilisierung von P450 BM-3 F87A wurden in Vorexperimenten verschiedene adsorptive und kovalente Methoden untersucht. Für alle Vorexperimente wurden 100 mg Trägermaterial (Ausnahme: EP-100, 50 mg) und 5 nmol P450 BM-3 F87A (aus Rohextrakt) verwendet.

15 Zur Auswahl eines geeigneten Trägermaterials wurde bei den adsorptiven Methoden 5 nmol P450 BM-3 F87A zur  $K_xPO_4$ -Puffer-(20 mM, pH 7,5, ad 1600  $\mu$ l) Trägermaterial-Suspension in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Die Reaktionsgefäße wurden nach Anbringen mittels Klebeband an die Außenseite eines 250 ml  
20 Rundkolbens eine Stunde am Rotationsverdampfer langsam zur Proteinimmobilisation über Kopf gedreht. Zur Bestimmung der Adsorptionskapazitäten wurden die Immobilisate eine Minute bei 9000 g zentrifugiert und 200  $\mu$ l des Überstandes zur Aktivitätsmessung entnommen.

25

#### b) Optimierte Immobilisierungsvorschrift für DEAE 650M und Super Q650M

30 Bis zu 81 nmol eines P450 BM-3 F87A-Rohextrakts oder Lyophilisats können pro ml sedimentiertem DEAE 650M Adsorptionsmaterial in 5 ml Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) immobilisiert werden. Bei dem SuperQ 650M Adsorptionsmaterial sind es bis zu 102 nmol eines P450 BM-3 F87A-Rohextrakts. Zur Immobilisierung wurde das Lyophilisat in 4 ml  $dH_2O$  in einem 15 ml Falcon-Reaktionsgefäß aufgenommen und mit  
35 einer Endkonzentration von 0,1 mM 12-pNCA versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde 1 ml der mit 5 ml Wasser zweimal gewaschenen und zentrifugierten (9000 g, 1 min) Adsorptionsmatrix zugegeben und eine halbe Stunde analog zu den im vorherigen Abschnitt beschriebenen Eppendorf-Reaktionsgefäßen  
40 über Kopf gedreht. Nach Zentrifugationen und Abnahme des Überstandes wurde das Immobilisat mit 5 ml Tris/HCl-Puffer (pH 7,5, 0,02 mM) versetzt, vorsichtig resuspendiert und erneut zentrifugiert (9000 g, 1min). Dieser Waschvorgang wurde zwei Mal wiederholt. Nach Zugabe von Tris/HCl-Puffer (0,1 M, pH 7,5) auf  
45 ein Endvolumen von 2,0 ml zum Immobilisat wurde dieses resuspendiert und in 200  $\mu$ l Aliquots auf 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt, die bereits 495  $\mu$ l dieses

Puffers enthielten. Nach Zugabe von 5 µl 12-pNCA (15 mM) und fünfminütiger Inkubationszeit wurde die Reaktion in einer Eppendorf-Schüttelapparatur (Ika-Vibrax, mit Janke und Kunkel Aufsatz VX2E) durch Zugabe von 100 µl NADPH (1 mM) gestartet und  
5 nach variierten Reaktionszeiten mit 100 µl 6 M KOH gestoppt. Nach Zentrifugation bei 9000 g (1 min) wurde der Überstand abgenommen und die Absorption bei 410 nm bestimmt.

Zur kovalenten Immobilisierung von P450 BM-3 F87A mittels  
10 Glutardialdehyd wurde P450 BM-3 F87A in einem 20 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5) aufgeschlossen. 5 g aminomodifizierter Trisopor-Gläser (Schueller, Durchmesser 500-800 µm) wurden bei Raumtemperatur zwischen drei und zwölf  
15 Stunden in einer geschlossenen Apparatur mit Glutardialdehyd bedampft. Die mit Glutardialdehyd aminomodifizierten Gläser zeigten eine rot-violette Farbe, die auch nach zweimaligem Waschen mit 100 ml Kaliumcarbonatlösung (50 mM, pH 7,8) über eine Fritte erhalten bleibt. 50 bis 150 mg dieser rot-violetten Gläser  
20 wurden mit 0,5-0,8 nmol P450 BM-3 F87A versetzt und bis zur Entfärbung der Lösung in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen in der Retsch-Kugelmühle bei niedrigster Stufe und 6°C eine Stunde lang geschüttelt.

#### 25 4. Enzym-Membranreaktor

Zur Überprüfung des Enzym-Membran-Reaktorkonzepts wurden 25 nmol P450 BM-3 F87A auf 4 ml SuperQ 650M immobilisiert und in das Reaktorreaktionsgefäß zu 200 ml Tris/HCl Puffer (pH 7,8) gegeben.  
30 Nach Zugabe von 1,2 µmol 12-pNCA bei einer Flußgeschwindigkeit von 40 ml/min wurde die Lösung 20 Minuten lang ohne Gegendruck auf das Filtrationsmodul durchmischt. Bei einem Gegendruck von 2 psi wurde durch Zugabe von 2 ml wäßriger NADPH-Lösung (1 mM) die Reaktion gestartet und der Reaktionsablauf durch die Bestimmung  
35 der Wellenlängen bei 410 nm verfolgt. Während des Reaktionsablaufs wurde NADPH-Lösung in 1 ml Schritten bis zur vollständigen 12-pNCA-Umsetzung zugegeben.

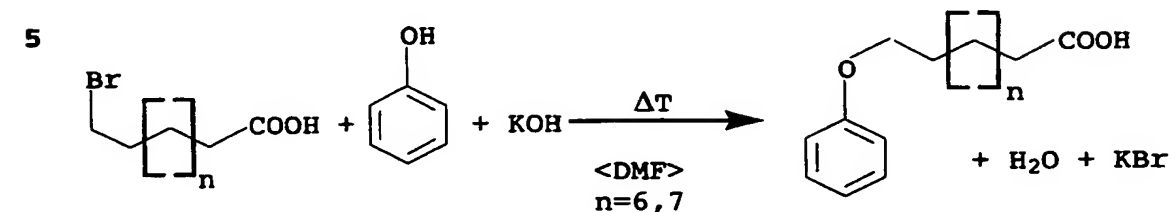
#### Referenzbeispiel 5: Chemische Synthesen

40 Alle <sup>1</sup>H-NMR-Spektren wurden mit einem 500 MHz-NMR-Gerät, alle <sup>13</sup>C-NMR mit einem 125 MHz-NMR-Gerät und CDCl<sub>3</sub> als Lösungsmittel aufgenommen.

#### 45 1. Herstellung von ω-Phenoxycarbonsäuren (PCA)

Reaktionsschema A zeigt zur direkten PCA-Synthese aus  $\omega$ -Bromo-carbonsäuren.

Reaktionsschema A



# Ansätze

	1,01 g	(3,77 mmol)	Bromundekansäure	oder
	1,05 g	(3,77 mmol)	Bromdodekansäure	
15	355 mg	(3,77 mmol)	Phenol	
	417 mg	(7,44 mmol)	Kaliumhydroxid	
	50 ml		DMF	

## Allgemeine Reaktionsvorschrift:

20

Zur in DMF gelösten Bromfettsäure gibt man Phenol und Kaliumhydroxid. Die Lösung wurde unter Rückfluß 6-7 Stunden lang auf 160°C erhitzt und die Reaktion mittels Dünnschichtchromatographie (DC, Laufmittel Petrolether :

25 Diethylether 1:1) verfolgt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der braune Niederschlag in einem

Wasser-Diethylether-Zweiphasensystem (1:1) gelöst und mit verdünnter Salzsäure wurde ein pH-Wert von 2 eingestellt. Nach Extraktion der wäßrigen Phase mit Diethylether wurden am

30 Rotationsverdampfer die vereinigten Diethyletherfraktionen vom Lösungsmittel befreit, in Petrolether:Essig-säureethylester 1:1 aufgenommen und mittels einer DC60-Kieselgelchromatographiesäule (Merck) und dem gleichen Laufmittelgemisch gereinigt.

## 35 Charakterisierung:

$\omega$ -Phenoxydodekansäure (12-PCA): Ausbeute: 76 %;  $m_p$ : = 98-99°C  
berechnet: C 73,93% H 9,65% O 16,41%, gefunden: C 73,92% H 9,67%

40  $^1H$ -NMR:  $\delta$ : = 7,26-7,29 (m, 2H, Phenyl-), 6,88-6,94 (m, 3H, Phenyl), 3,94 (t, 2H, Phenyl-O-CH<sub>2</sub>-, J= 6,5 Hz), 2,35 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-COO, J= 7,5 Hz), 1,74-1,80 (m, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1,59-1,66 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO), 1,42-1,48 (m, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1,29-1,35 (m, 12 H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CH<sub>2</sub>-).

45  $^{13}C$ -NMR:  $\delta$ : = 180,4 (-COO), 159,3 (C 1'), 129,8 (C 3'), 120,8 (C

4'), 114,7 (C 2'), 68,3 (-O-CH<sub>2</sub>-), 34,5 (-CH<sub>2</sub>-COO-), 29,9, 29,8, 29,7, 29,7, 29,5, 29,4, 29,1, 26,5, 25,1 (C-3-C-11).

$\omega$ -Phenoxyundekansäure (11-PCA): Ausbeute: 78 %;  $m_p$ : = 95°C

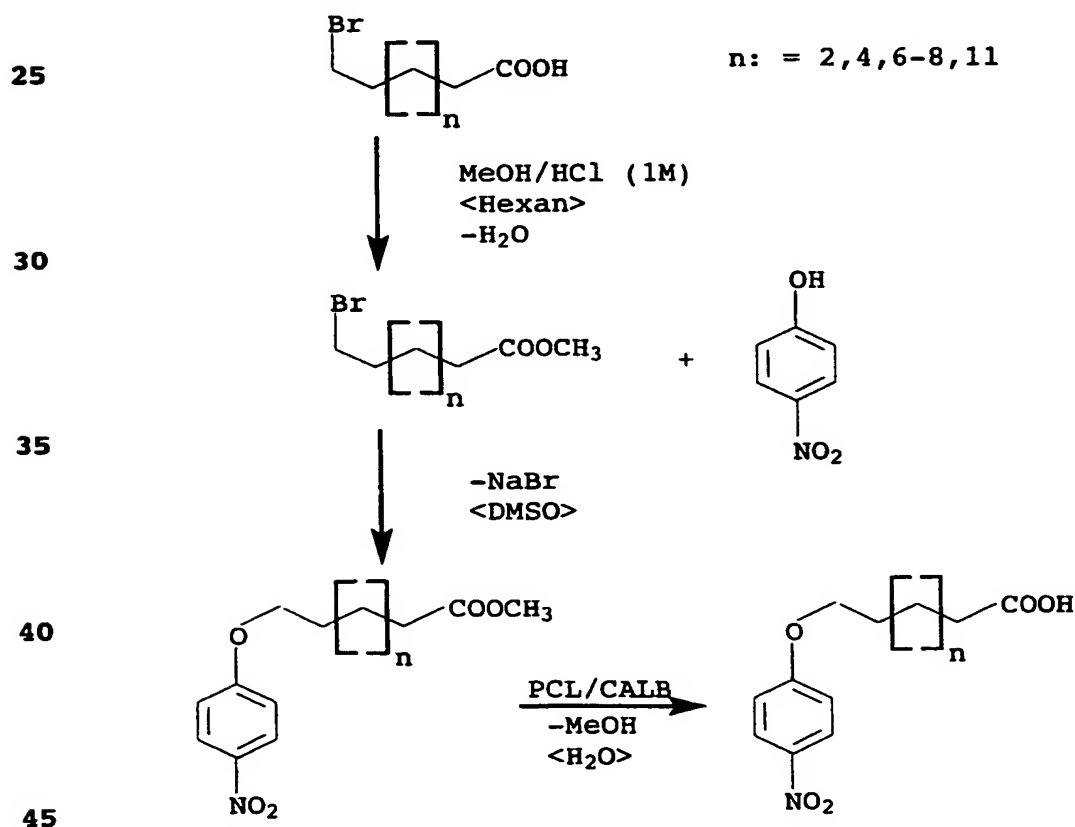
5 berechnet: C 73,35% H 9,41% O 17,24%, gefunden: C 73,32% H 9,44%

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$ : = 7,18-7,21 (m, 2H, Phenyl-), 6,81-6,86 (m, 3H, Phenyl), 3,87 (t, 2H, Phenyl-O-CH<sub>2</sub>-, J= 6,5 Hz), 2,27 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-COO, J= 7,5 Hz), 1,67-1,73 (m, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1,53-1,57 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO), 1,35-1,39 (m, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1,18-1,30 (m, 10H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-CH<sub>2</sub>-).

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$ : = 180,5 (-COO), 159,5 (C 1'), 129,8 (C 3'), 120,7 (C 4'), 114,7 (C 2'), 68,2 (-O-CH<sub>2</sub>-), 34,5 (-CH<sub>2</sub>-COO-), 29,9, 29,7, 29,7, 29,7, 29,6, 29,4, 26,4, 25,0 (C-3-C-10).

## 2. Herstellung von p-Nitrophenoxy-carbonsäuren (pNCA)

Im Gegensatz zu den PCA-Synthesen war eine entsprechende Synthese der pNCA-Verbindungen nicht möglich. Die pNCA-Synthese gelang erst, nachdem die  $\omega$ -Bromcarbonsäuren verestert waren und wasserfrei gearbeitet wurde.



Allgemeine Vorschrift zur Synthese:

- Ausgehend von  $\omega$ -Bromcarbonsäuren, wurden  $\omega$ -Bromcarbonsäuremethylester und  $\omega$ -Brom-carbonsäureethylester in Hexan entsprechend einer Standardmethode (Becker et al. 1993) mit wasserfreier Methanol- oder Ethanolllösung, die 1 M HCl enthält, verestert. Der Reaktions-verlauf wurde mittels DC (Laufmittel Hexan : Diethylether : Essigsäure 70:30:1) verfolgt. Die wäßrige Phase wird zwei Mal mit Diethylether extrahiert, zwei Mal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und einmal mit demineralisiertem Wasser gewaschen, über Nacht mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und chromatographisch aufgereinigt, wobei als Laufmittel Petrolether : Diethylether im Verhältnis 70:30 verwendet wird. Nachdem das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer evaporiert war, wurden die Ester eine Stunde lang ans Hochvakuum angeschlossen. Um die pNCA-Ester darzustellen wurde zu 17 mmol  $\omega$ -Brom-carbonsäureester, die in 100 ml DMSO gelöst wurden, ein geringer Überschuß von 18,5 nmol p-Nitrophenol gegeben. Die Lösung wurde unter Rückflußkühlung für zwei bis drei Stunden auf 120°C erhitzt. Nach Abkühlen der leicht bräunlichen Lösung auf Raumtemperatur wurde tropfenweise demineralisiertes Wasser zugegeben, um die pNCAester auszufällen. Das Präzipitat wurde filtriert, mit 1,5 Liter eiskaltem Wasser zur Entfernung von überschüssigem p-Nitrophenol gewaschen und in DMSO zu einem weißen Pulver umkristallisiert. Zur Hydrolyse der pNCAester wurde eine Lipasemischung, bestehend aus 100 mg *Pseudomonas cepacia* (PCL) und 100 mg *Candida antarctica* Lipase B von Amano (Nagoya, Japan), zu einer 100 ml Aceton/Wasser Mischung (pH 7,5, 0,2 M Kaliumphosphat, bis zu 50 % Aceton) zugegeben. Nach Zugabe der pNCAester (5 mmol) wurde die Suspension bei Raumtemperatur bis zu 16 h gerührt. Zur Entfernung des Lipaseimmobilisats wurde die klare Suspension filtriert und die pNCAs durch Evaporierung von Aceton kristallisiert. Die pNCA-Verbindungen wurden mit kaltem Wasser gewaschen, in DMSO umkristallisiert und chromatographisch über Silicagel DC60 (Merck, Darmstadt) (Petrolether : Essigsäureethylester 1:1 bis 1:3) gereinigt.

#### Charakterisierung der pNCAs:

- Die angegebenen Ausbeuten der pNCA beziehen sich immer auf die entsprechenden pNCAester als Edukte, und die Ausbeuten für die pNCAester beziehen sich immer auf die zugehörigen  $\omega$ -Bromcarbonsäuren.

p-Nitrophenoxyhexansäure (6-pNCA): Ausbeute: 81 %;  $m_p$ := 94°C

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$ : = 8,18 (d, 2H,  $\text{NO}_2$ -Phenyl-,  $J$  = 9,3 Hz), 6,94 (d, 2H, Phenyl-O-,  $J$  = 9,3 Hz), 4,06 (t, 2H, Phenyl-O- $\text{CH}_2$ -,  $J$  = 6,3 Hz), 2,42 (t, 2H,  $-\text{CH}_2\text{-COO}$ ,  $J$  = 7,1 Hz), 1,80-1,92 (m, 2H,  $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$ -), 1,68-1,77 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}$ ), 1,49-1,61 (m, 2H,  $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$ -).

5

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$ : = 180,0 ( $-\text{COOH}$ ), 164,1 (C-4'), 141,4 (C-1'), 125,9 (C-2'), 114,4 (C-3'), 68,5 ( $-\text{O-CH}_2$ -), 33,9 ( $-\text{CH}_2\text{-COOH}$ ), 28,6, 25,5, 24,3 (C-3, C-5, C-4).

10 p-Nitrophenoxyhexansäureethylester (6-pNCAEt): Ausbeute: 81 %

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$ : = 8,09 (d, 2H,  $\text{NO}_2$ -Phenyl-,  $J$  = 9,3 Hz), 6,85 (d, 2H, Phenyl-O-,  $J$  = 9,3 Hz), 4,05 (q, 2H,  $-\text{COO-CH}_2$ -), 3,97 (t, 2H, Phenyl-O- $\text{CH}_2$ -,  $J$  = 6,4 Hz), 2,26 (t, 2H,  $-\text{CH}_2\text{-COO}$ ,  $J$  = 7,3 Hz), 1,69-1,82 (m, 2H,  $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$ -), 1,57-1,67 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}$ ), 1,40-1,50 (m, 2H,  $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$ -), 1,17 (t, 3H,  $-\text{COOCH}_2\text{-CH}_3$ ).

15

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$ : = 173,7 ( $-\text{COO}$ ), 164,3 (C 4'), 141,5 (C 1'), 126,0 (C 2'), 114,6 (C 3'), 68,7 ( $-\text{O-CH}_2$ -), 60,4 ( $-\text{COO-CH}_2$ -), 34,3 ( $-\text{CH}_2\text{-COO-}$ ), 28,8, 25,7, 24,8 (C-3, C-5, C-4), 14,4 ( $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$ ).

20

p-Nitrophenoxyoktansäure (8-pNCA): Ausbeute: 92 %;  $m_p$ : = 98°C

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$ : = 8,11 (d, 2H,  $\text{NO}_2$ -Phenyl-,  $J$  = 9,2 Hz), 6,86 (d, 2H, Phenyl-O-,  $J$  = 9,3 Hz), 3,97 (t, 2H, Phenyl-O- $\text{CH}_2$ -,  $J$  = 6,4 Hz), 2,29 (t, 2H,  $-\text{CH}_2\text{-COO}$ ,  $J$  = 7,4 Hz), 1,69-1,80 (m, 2H,  $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$ -), 1,56-1,61 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}$ ), 1,32-1,43 (m, 6H,  $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2)_3\text{-CH}_2$ -).

25

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$ : = 180,2 ( $-\text{COOH}$ ), 164,3 (C 4'), 141,4 (C 1'), 125,9 (C 2'), 114,4 (C 3'), 68,8 ( $-\text{O-CH}_2$ -), 34,0 ( $-\text{CH}_2\text{-COOH}$ ), 28,9, 28,9, 28,9, 25,8, 24,6 (C-3-C-7).

30

35 p-Nitrophenoxyoktansäuremethylester (8-pNCAMe): Ausbeute: 79 %

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$ : = 8,10 (d, 2H,  $\text{NO}_2$ -Phenyl-,  $J$  = 9,2 Hz), 6,86 (d, 2H, Phenyl-O-,  $J$  = 9,3 Hz), 3,97 (t, 2H, Phenyl-O- $\text{CH}_2$ -,  $J$  = 6,5 Hz), 3,59 (s, 3H,  $-\text{COOCH}_3$ ), 2,24 (t, 2H,  $-\text{CH}_2\text{-COO}$ ,  $J$  = 7,4 Hz), 1,69-1,77 (m, 2H,  $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$ -), 1,51-1,59 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}$ ), 1,27-1,43 (m, 6H,  $-\text{O-(CH}_2)_2\text{-(CH}_2)_3$ -).

40

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$ : = 174,2 ( $-\text{COO}$ ), 164,3 (C 4'), 141,4 (C 1'), 125,9 (C 2'), 114,4 (C 3'), 68,8 ( $-\text{O-CH}_2$ -), 51,5 ( $-\text{COO-CH}_3$ ), 34,0 ( $-\text{CH}_2\text{-COO-}$ ), 29,0, 28,9, 28,9, 25,8, 24,9 (C-3-C-7).

45

p-Nitrophenoxydekansäure (10-pNCA): Ausbeute: 84 %;  $m_p$ : = 101°C

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$ : = 8,18 (d, 2H, NO<sub>2</sub>-Phenyl-, J= 9,2 Hz), 6,93 (d, 2H, Phenyl-O-, J= 9,3 Hz), 4,03 (t, 2H, Phenyl-O-CH<sub>2</sub>-, J= 6,5 Hz),  
 5 2,35 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-COO, J= 7,4 Hz), 1,75-1,86 (m, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-),  
 1,60-1,63 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO), 1,32-1,45 (m, 10H,  
 -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-CH<sub>2</sub>-).

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$ : = 180,4 (-COO), 164,4 (C 4'), 141,5 (C 1'), 126,1 (C  
 10 2'), 114,6 (C 3'), 69,1 (-O-CH<sub>2</sub>-), 34,2 (-CH<sub>2</sub>-COOH), 29,9, 29,4,  
 29,4, 29,3, 29,2, 26,3, 26,1, 24,8 (C-3-C-9).

p-Nitrophenoxydekansäuremethylester (10-pNCAME): Ausbeute: 73 %

15 <sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$ : = 8,11 (d, 2H, NO<sub>2</sub>-Phenyl-, J= 9,2 Hz), 6,86 (d, 2H,  
 Phenyl-O-, J= 9,3 Hz), 3,97 (t, 2H, Phenyl-O-CH<sub>2</sub>-, J= 6,5 Hz),  
 3,59 (s, 3H, -COOCH<sub>3</sub>), 2,23 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-COO, J= 7,5 Hz),  
 1,68-1,77 (m, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1,52-1,57 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO),  
 1,22-1,45 (m, 10H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-CH<sub>2</sub>-).

20

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$ : = 174,2 (-COO), 164,2 (C 4'), 141,2 (C 1'), 125,8 (C  
 2'), 114,3 (C 3'), 68,8 (-O-CH<sub>2</sub>-), 51,3 (-COOCH<sub>3</sub>), 34,3  
 (-CH<sub>2</sub>-COO-), 29,2, 29,1, 29,1, 29,0, 28,9, 25,8, 24,8 (C-3-C-9).

25 p-Nitrophenoxyundekansäure (11-pNCA): Ausbeute: 89 %;  $m_p$ : = 102°C

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$ : = 8,19 (d, 2H, NO<sub>2</sub>-Phenyl-, J=9,2 Hz), 6,94 (d, 2H,  
 Phenyl-O-, J= 9,1 Hz), 4,05 (t, 2H, Phenyl-O-CH<sub>2</sub>-, J= 6,5 Hz),  
 2,35 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-COO, J= 7,6 Hz), 1,79-1,84 (m, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-),  
 30 1,61-1,66 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO), 1,43-1,49 (m, 2H,  
 -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1,32-1,45 (m, 10H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-CH<sub>2</sub>-).

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$ : = 180,12 (-COO), 164,3 (C 4'), 141,3 (C 1'), 125,9 (C  
 35 2'), 114,4 (C 3'), 68,9 (-O-CH<sub>2</sub>-), 34,0 (-CH<sub>2</sub>-COO-), 29,4, 29,3,  
 29,3, 29,2, 29,0, 29,0, 25,9, 24,6 (C-3-C-10).

p-Nitrophenoxyundekansäuremethylester (11-pNCAME): Ausbeute: 80 %

40 <sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$ : = 8,18 (d, 2H, NO<sub>2</sub>-Phenyl-, J=9,3 Hz), 6,93 (d, 2H,  
 Phenyl-O-, J= 9,2 Hz), 4,03 (t, 2H, Phenyl-O-CH<sub>2</sub>-, J= 6,5 Hz),  
 3,66 (s, 3H, -COOCH<sub>3</sub>), 2,29 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-COO, J= 7,5 Hz),  
 1,75-1,86 (m, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1,58-1,64 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO),  
 1,29-1,45 (m, 12H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CH<sub>2</sub>-).

45

## 32

$^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta$ := 174,5 (-COO), 164,4 (C 4'), 141,5 (C 1'), 126,1 (C 2'), 114,6 (C 3'), 69,0 (-O-CH<sub>2</sub>-), 51,6 (-COOCH<sub>3</sub>), 34,2 (-CH<sub>2</sub>-COO-), 29,6, 29,5, 29,4, 29,4, 29,3, 29,1, 26,1, 25,1 (C-3-C-10).

5

p-Nitrophenoxydodekansäure (12-pNCA): Ausbeute: 89 %;  $m_p$ := 106°C

berechnet: C 64,07% H 8,07% N 4,06%, O 23,71%, gefunden: C 63,99 % H 8,18% N 4,15%

10

$^1\text{H}$ -NMR:  $\delta$ := 8,19 (d, 2H, NO<sub>2</sub>-Phenyl-, J=9,3 Hz), 6,94 (d, 2H, Phenyl-O-, J= 9,4 Hz), 4,04 (t, 2H, Phenyl-O-CH<sub>2</sub>-, J= 6,6 Hz), 2,35 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-COO, J= 7,5 Hz), 1,79-1,84 (m, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1,60-1,66 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO), 1,43-1,49 (m, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1,29-1,35 (m, 12H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CH<sub>2</sub>-).

15

$^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta$ := 180,4 (-COO), 164,3 (C 4'), 141,3 (C 1'), 125,9 (C 2'), 114,4 (C 3'), 68,9 (-O-CH<sub>2</sub>-), 34,1 (-CH<sub>2</sub>-COO-), 29,5, 29,4, 29,3, 29,2, 29,2, 29,0, 29,0, 25,9, 24,7 (C-3-C-11).

20

p-Nitrophenoxydodekansäureethylester (12-pNCAEt): Ausbeute: 73 %

$^1\text{H}$ -NMR:  $\delta$ := 8,18 (d, 2H, NO<sub>2</sub>-Phenyl-, J=9,2 Hz), 6,94 (d, 2H, Phenyl-O-, J= 9,3 Hz), 4,12 (q, 2H, -COO-CH<sub>2</sub>-, J= 7,1 Hz) 4,05 (t, 2H, Phenyl-O-CH<sub>2</sub>-, J= 6,5 Hz), 2,29 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-COO, J= 7,5 Hz), 1,70-1,87 (m, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1,59-1,69 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO), 1,32-1,45 (m, 14H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1,26 (t, 3H, -COOCH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, J= 7,2 Hz).

25

$^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta$ := 174,8 (-COO), 164,4 (C 4'), 141,5 (C 1'), 126,1 (C 2'), 114,6 (C 3'), 69,0 (-O-CH<sub>2</sub>-), 60,5 (-COO-CH<sub>2</sub>-), 34,2 (-CH<sub>2</sub>-COO-), 29,6, 29,5, 29,4, 29,4, 29,3, 29,2, 29,1, 26,1, 25,1 (C-3-C-11), 14,4 (-COO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>).

30

35 p-Nitrophenoxydodekansäure (15-pNCA): Ausbeute: 87 %;  $m_p$ := 115°C

$^1\text{H}$ -NMR:  $\delta$ := 8,19 (d, 2H, NO<sub>2</sub>-Phenyl-, J=9,2 Hz), 6,94 (d, 2H, Phenyl-O-, J= 9,3 Hz), 4,05 (t, 2H, Phenyl-O-CH<sub>2</sub>-, J= 6,5 Hz), 2,35 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-COO, J= 7,5 Hz), 1,79-1,85 (m, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1,59-1,66 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO), 1,43-1,49 (m, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1,26-1,35 (m, 18H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>-CH<sub>2</sub>-).

40

45



$^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta$ : = 180,0 (-COO), 164,3 (C 4'), 141,3 (C 1'), 126,0 (C 2'), 114,4 (C 3'), 68,9 (-O-CH<sub>2</sub>-), 34,0 (-CH<sub>2</sub>-COO-), 29,6, 29,6, 29,5, 29,4, 29,4, 29,3, 29,3, 29,2, 29,1, 29,0, 25,9, 24,7 (C-3-C-14).

5

p-Nitrophenoxypentadekansäuremethylester (15-pNCAME): Ausbeute: 75 %

$^1\text{H}$ -NMR:  $\delta$ : = 8,19 (d, 2H, NO<sub>2</sub>-Phenyl-, J=9,2 Hz), 6,94 (d, 2H, Phenyl-O-, J= 9,3 Hz), 4,05 (t, 2H, Phenyl-O-CH<sub>2</sub>-, J= 6,5 Hz), 3,66 (s, 3H, -COOCH<sub>3</sub>), 2,26 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-COO, J= 7,5 Hz), 1,79-1,85 (m, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1,59-1,66 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO), 1,43-1,49 (m, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1,26-1,35 (m, 18H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>-CH<sub>2</sub>-).

15

$^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta$ : = 174,6 (-COO), 164,3 (C 4'), 141,3 (C 1'), 126,0 (C 2'), 114,4 (C 3'), 68,9 (-O-CH<sub>2</sub>-), 51,7 (-COOCH<sub>3</sub>), 34,0 (-CH<sub>2</sub>-COO-), 29,7, 29,6, 29,5, 29,5, 29,4, 29,3, 29,3, 29,2, 29,1, 29,1, 26,1, 25,0 (C-3-C-14).

20

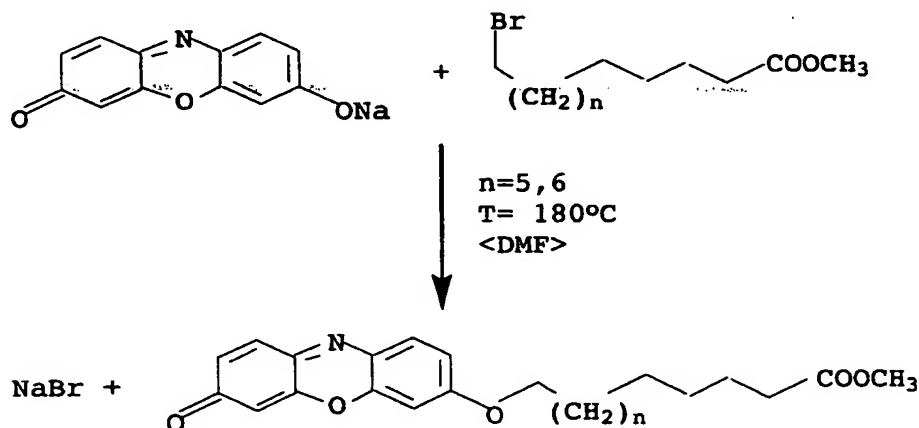
### 3. Herstellung von Resorufinylcarbonsäuren (RCA)

a) Darstellung von  $\omega$ -Resorufinyldekanäuremethylester und  $\omega$ -Resorufinylundekansäure-methylester

25

Zur RCA-Synthese wurden die  $\omega$ -Bromcarbonsäuren, entsprechend dem Vorgehen bei den pNCA-Verbindungen verestert, mit dem Natriumresorufinsalz in DMF umgesetzt und mittels einer PCL/CAL-B-Lipasemischung hydrolysiert.

30



35

40

45

Ansatz für  $\omega$ -Resorufinyllaurinsäuremethylester:

0,90 g (3,1 mmol) 12-Bromlaurinsäuremethylester  
 0,72 g (3,1 mmol) Resorufin  
 5 50 ml DMF

Ansatz für  $\omega$ -Resorufinylundekansäuremethylester:

0,75 g (2,7 mmol) 11-Bromundekansäuremethylester  
 10 0,63 g (2,7 mmol) Resorufin  
 50 ml DMF

Durchführung:

- 15 Zur Lösung des Bromfettsäureesters in DMF gibt man Resorufin, das sich nicht vollständig löst, zu. Die dunkelviolette Suspension wird unter Rückfluß vier Stunden lang erhitzt und die Reaktion mittels DC (Laufmittel Petrolether:Diethylether 1:1) verfolgt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wird der braune
- 20 Niederschlag in Petrolether:Essigsäureethylester 1:1 eine halbe Stunde lang gelöst und mittels einer DC60 (Merck)-Kieselgelchromatographiesäule in dem gleichen Laufmittelgemisch gereinigt. Die Säule sollte nicht zu groß gewählt werden, da die Verbindung in geringem Maße auf der Säule
- 25 zerfällt.

$\omega$ -Resorufinyllaurinsäuremethylester: Ausbeute: 17 %

- <sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$ := 7,62 (d, 1H, -H-9', J= 8,89 Hz), 7,35 (d, 1H, -H-1', J= 9,79 Hz), 6,85 (dd, 1H, -H-8', J<sub>8',9'</sub>= 8,87 Hz, J<sub>8',6'</sub>= 2,41 Hz), 6,76 (dd, 1H, -H-2', J<sub>2',1'</sub>= 9,74 Hz, J<sub>2',4'</sub>= 1,74 Hz), 6,73 (d, 1H, -H-6', J= 2,40 Hz), 6,25 (d, 1H, -H-4', J= 1,74 Hz), 3,98 (t, 2H, Phenyl-O-CH<sub>2</sub>-, J= 6,50 Hz), 3,59 (s, 3H, -COO-CH<sub>3</sub>), 2,23 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-COO, J= 7,50 Hz), 1,73-1,79 (m, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-),
- 35 1,53-1,56 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO), 1,37-1,41 (m, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1,22-1,29 (m, 12H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CH<sub>2</sub>-).

- <sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$ := 186,7 (-C 3'), 174,7 (-COO), 163,7, 150,3 146,1, 145,7 (C 4a', C-5a', C-9a', C-10a'), 135,1, 134,5, 131,9, 128,7, 114,5, 107,1, 100,8 (C 2', C 4', C 1', C 9', C 6', C 8', C 9'),
- 40 69,5 (-O-CH<sub>2</sub>-), 51,9 (-COO-CH<sub>3</sub>), 34,5 (-CH<sub>2</sub>-COO-), 30,1, 29,8, 29,7, 29,7, 29,6, 29,5, 29,3, 26,3, 25,3 (C-3-C-11).

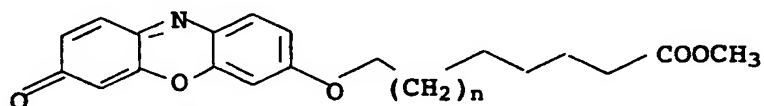
- $\omega$ -Resorufinylundekansäuremethylester: Ausbeute: 15 %;
- 45

- <sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$ : = 7,62 (d, 1H, -H-9', J = 8,91 Hz), 7,35 (d, 1H, -H-1', J = 9,70 Hz), 6,86 (dd, 1H, -H-8', J<sub>8',9'</sub> = 8,90 Hz, J<sub>8',6'</sub> = 2,53 Hz), 6,76 (dd, 1H, -H-2', J<sub>2',1'</sub> = 9,72 Hz, J<sub>2',4'</sub> = 1,95 Hz), 6,73 (d, 1H, -H-6', J = 2,54 Hz), 6,25 (d, 1H, -H-4', J = 1,94 Hz), 3,98 (t, 2H, Phenyl-O-CH<sub>2</sub>-, J = 6,49 Hz), 3,60 (s, 3H, -COO-CH<sub>3</sub>), 2,23 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-COO, J = 7,50 Hz), 1,74-1,79 (m, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1,54-1,57 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO), 1,35-1,42 (m, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1,18-1,29 (m, 10H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-CH<sub>2</sub>-).
- <sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$ : = 186,7 (-C 3'), 174,7 (-COO), 163,7, 150,3 146,1, 145,7 (C 4a', C-5a', C-9a', C-10a'), 135,0, 135,0, 132,0, 128,6, 114,5, 107,0, 100,8 (C 2', C 4', C 1', C 9', C 6', C 8', C 9'), 69,5 (-O-CH<sub>2</sub>-), 51,8 (-COO-CH<sub>3</sub>), 34,5 (-CH<sub>2</sub>-COO-), 29,9, 29,8, 29,7, 29,6, 29,5, 29,3, 26,3, 25,3 (C-3-C-10).

15

b) Darstellung von  $\omega$ -Resorufinyldodekansäure und  $\omega$ -Resorufinylundekansäure

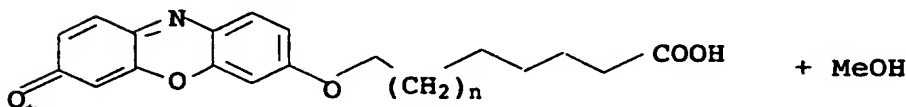
20



25

0,1 M wässriger Phosphatpuffer pH 7,3  
Lipase; T = 40 °C; n = 5,6  
10 % Aceton als Lösungsvermittler

30



35

Vorversuche:

- Chemische Hydrolyse mittels NaOH führte zur Spaltung des Esters, jedoch konnte das gewünschte gelb-orange Produkt nur in Ausbeuten von 10 % isoliert werden; die Ursache liegt darin, daß der Resorufinyl-Aromat in stark alkalischen Lösungen (pH > 12) unter Farbverlust zerfällt. Auf DC-Plättchen waren fünf Produkte erkennbar. Im alkalischen Medium zeigt der Resorufinylfettsäureester eine grünliche Färbung. Die Spaltung mittels Lipasen verlief nach Optimierung der Aufarbeitung wesentlich erfolgreicher. Zur Wahl einer geeigneten Lipase wurden

folgende Lipasen im Thermomixer bei 40° C über Nacht in einem 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,5 mit 10 % Aceton als Lösungsvermittler getestet: *Candida antarctica* Lipase A und B, *Aspergillus niger* Lipase und *Pseudomonas cepacia* Lipase (PCL).

5

Die *Candida antarctica* Lipase B und die PCL spalten die Resorufinylcarbonsäureester, wobei letztendlich die PCL-Lipase zur präparativen Esterspaltung verwendet wurde.

#### 10 Ansatz für $\omega$ -Resorufinyldodekansäure:

40 mg	(94 $\mu$ mol)	$\omega$ -Resorufinyldodekansäuremethylester
2 ml		Aceton
18 ml		Natriumphosphatpuffer, pH 7,3
15 Spatelspitze		PCL-Lipase

#### Ansatz für $\omega$ -Resorufinylundekansäure:

36 mg	(30 $\mu$ mol)	$\omega$ -Resorufinylundekansäuremethylester
2 ml		Aceton
20 18 ml		Natriumphosphatpuffer, pH 7,3
Spatelspitze		PCL-Lipase

#### Durchführung:

25 In einem 50 ml Rundkolben werden die Ester in Aceton gelöst, nach Zugabe von 9 ml Natriumphosphatpuffer, pH 7,3 wird eine Spatelspitze PCL zugegeben und bei 40°C über Nacht inkubiert. Der Reaktionsablauf wird mittels DC (Laufmittel Petrolether : Diethylether 1:1) verfolgt. Nach mehrfacher vorsichtiger

30 Extraktion mittels Chloroform wird die Chloroformphase zwei Mal mit demineralisiertem Wasser gewaschen, über Natriumsulfat vier Stunden getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingeengt.

#### 35 $\omega$ -Resorufinyllaurinsäure: Ausbeute: 73 %

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$ := 7,62 (d, 1H, -H-9', J= 8,9 Hz), 7,35 (d, 1H, -H-1', J= 9,8 Hz), 6,85 (dd, 1H, -H-8',  $J_{8',9'}= 8,87$  Hz,  $J_{8',6'}= 2,4$  Hz), 6,76 (dd, 1H, -H-2',  $J_{2',1'}= 9,7$  Hz,  $J_{2',4'}= 1,7$  Hz), 6,73 (d, 1H, -H-6', J= 2,4 Hz), 6,25 (d, 1H, -H-4', J= 1,7 Hz), 3,98 (t, 2H, Phenyl-O-CH<sub>2</sub>-, J= 6,5 Hz), 2,34 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-COO, J= 7,5 Hz), 1.73-1.79 (m, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.55-1.59 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO), 1.37-1.41 (m, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.22-1.29 (m, 12H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CH<sub>2</sub>-).

45

$^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta$ := 186,6 (-C 3'), 180,4 (-COO), 163,7, 150,3 146,1, 145,7 (C 4a', C-5a', C-9a', C-10a'), 135,1, 134,5, 131,9, 128,7, 114,5, 107,1, 100,8 (C 2', C 4', C 1', C 9', C 6', C 8', C 9'), 69,5 (-O-CH<sub>2</sub>-), 34,2 (-CH<sub>2</sub>-COO-), 30,1, 29,8, 29,7, 29,7, 29,6, 5 29,5, 29,3, 26,3, 25,3 (C-3-C-11).

$\omega$ -Resorufinylundekansäure: Ausbeute: 78 %

$^1\text{H}$ -NMR:  $\delta$ := 7,63 (d, 1H, -H-9', J= 8,9 Hz), 7,35 (d, 1H, -H-1', J= 9,7 Hz), 6,85 (dd, 1H, -H-8', J<sub>8',9'</sub>= 8,9 Hz, J<sub>8',6'</sub>= 2,53 Hz), 6,76 (dd, 1H, -H-2', J<sub>2',1'</sub>= 9,7 Hz, J<sub>2',4'</sub>= 1,9 Hz), 6,73 (d, 1H, -H-6', J= 2,5 Hz), 6,25 (d, 1H, -H-4', J= 1,9 Hz), 3,98 (t, 2H, Phenyl-O-CH<sub>2</sub>-, J= 6,5 Hz), 2,35 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-COO, J= 7,5 Hz), 1,74-1,79 (m, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1,54-1,59 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO), 15 1,35-1,42 (m, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1,18-1,29 (m, 10H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-CH<sub>2</sub>-).

$^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta$ := 186,7 (-C 3'), 180,7 (-COO), 163,7, 150,3 146,1, 145,7 (C 4a', C-5a', C-9a', C-10a'), 135,0, 135,0, 132,0, 128,6, 20 114,5, 107,0, 100,8 (C 2', C 4', C 1', C 9', C 6', C 8', C 9'), 69,5 (-O-CH<sub>2</sub>-), 34,1 (-CH<sub>2</sub>-COO-), 29,9, 29,8, 29,7, 29,6, 29,5, 29,3, 26,3, 25,3 (C-3-C-10).

c) Aktivitätstest von P450 BM-3 mit

25  $\omega$ -Resorufinylaurinsäure und  $\omega$ -Resorufinylundekansäure:

Eine Spatelspitze der 11- oder 12-RCA wurde in 0,5 ml Aceton, Ethanol, THF, Dioxan und 5,5 ml Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5, 0,1 M) gelöst. Zu den als Lösungsvermittler fungierenden organischen 30 Lösungsmitteln wurde 5 ml Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5, 0,1 M) gegeben. Nach Zugabe von 5 nmol P450 wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und das P450 BM-3 durch Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  NADPH (50  $\mu\text{M}$ ) reduziert. Nach einer Stunde wurden 200  $\mu\text{l}$  der 35 jeweiligen Reaktionsansätze in eine Mikrotiterplatte überführt. In der zweiten Reihe sind zusätzlich entsprechende Blindproben ohne NADPH-Zugabe pipettiert.

Referenzbeispiel 6: Analytische Methoden

40 1. Proteintrennung in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels SDS-PAGE können Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Gereinigte Proteinproben wurden vor der Gelelektrophorese 45 1:1 mit SDS-Probenpuffer (Tris/HCl 500 mM, pH 6,8, Glycerin 10 % (v/v), SDS 20 % (w/v), Mercaptoethanol 2 % (w/v), Bromphenolblau 0,05 %) vermischt und 5 min zur Proteindenaturierung auf 95°C

erhitzt. Zur Analyse der Proteinexpression in *E. coli* Zellen wurden nach fünfstündiger Induktionsphase ( $OD_{578} = 1,5-2,0$ ) 1 ml der Kultur abpipettiert und bei 12000 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 100 µl des Probenpuffers aufgeschlossen und 1 min bei 12000 g zentrifugiert. Nach Abkühlen der Proteinproben auf Eis erfolgte die Proteinauftrennung im Elektrophoresepuffer (9,0 g Tris, 43,2 g Glycerin, 3,0 g SDS, ddH<sub>2</sub>O ad 600 ml) bei 25 mA pro Gel.

- 10 Als Proteinstandards dienten ein Niedermolekulargewichts-Marker (Phosphorylase B 97,4 kDa, BSA 66,3 kDa, Ovalbumin 45,0 kDa, Carboanhydrase 31,0 kDa, Trypsininhibitor 21,5 kDa, Lysozym 14,4 kDa) und ein Hochmolekulargewichts-Kit (Myosin 200 kDa, β-Galaktosidase 116,25 kDa, Phosphorylase B 97,4 kDa, BSA 66,3 kDa, Ovalbumin 45 kDa) von Bio-Rad (Richmond, USA).

- Zur Proteintrennung wurde ein 7,5 prozentiges Trenngel (2,5 ml Tris/HCl (1,5 M, pH 8,8), 100 µl SDS (10% m/v), 2,5 ml Acrylamid : N,N'-Methylenbisacrylamid 30 : 1 (Roth), 50 µl APS, 5 µl TEMED) und 4 prozentiges Sammelgel (1 ml Sammelgelpuffer (12,11 g Tris, 0,8 g SDS, ad H<sub>2</sub>O 200 ml, pH 6,8 mit HCl eingestellt), 0,52 µl Acrylamid : N,N'-Methylen-bisacrylamid 30:1 (Roth), 40 µl APS 10 % (w/v), 4 µl TEMED verwendet. Im Anschluß an die Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine drei Stunden lang unter langsamem Schütteln mit Färbelösung (0,1 % Coomassie Brilliant Blue R250, 10 % (v/v) Essigsäure, 30 % Methanol) blau gefärbt. Die Inkubation in Entfärbelösung (10 % (v/v) Essigsäure, 30 % Methanol) erfolgte bis deutliche Proteinbanden sichtbar wurden. Zur Dokumentation wurde das Gel luftblasenfrei zwischen ein Cellulose-Filterpapier und eine Kopierfolie gelegt und zwei Stunden im Gelrockner (Bio-Rad, Model 583) bei 80°C unter Hausvakuum getrocknet.

## 2. Bestimmung des Proteingehalts mittels BCA-Nachweis

- Proteinkonzentrationen wurden mittels des Bicinchoninsäure-(BCA) Protein-Nachweissystems von Pierce (St. Augustin, Deutschland) spektrometrisch bei 562 nm nach Herstellerangaben entsprechend dem Standardprotokoll bestimmt. Kalibriergeraden wurden mit BSA-Verdünnungen aufgenommen.

## 3. Spektroskopische Nachweismethoden

Alle spektroskopischen UV-Vis Nachweise wurden unter aeroben Bedingungen in einem Pharmacia Spectrophotometer, Modell BioChrom4060 (APB, Uppsala, Schweden), mit BioChrom4060 Windows 3.11 Software v2.0 durchgeführt.

5

a) Bestimmung der P450 Konzentration

P450 BM-3 Konzentrationen wurden mittels der CO-Differenzspektroskopiemethode (Omura et al. 1964) und einem

- 10 Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon = 91 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 125 nm/min in 0,1 nm Intervallen bestimmt. Dazu wurde zu 5 ml phosphatgepuffertem (20 mM, pH 7,3 bis 7,5) P450 BM-3 Rohextrakt eine Spatelspitze Natriumdithionit und 10  $\mu\text{l}$  einer 0,1 prozentigen (w/v) wäßrigen
- 15 Methylviologen-Lösung gegeben. Die abhängig von der P450 BM-3 Konzentration tiefblaue bis blaugrüne Probe wurde in zwei Fraktionen aufgeteilt. Eine der beiden Fraktionen wurde eine Minute lang mit CO begast, wobei Schaumbildung zu vermeiden ist, die andere dient als Referenz für die differenzspektroskopische
- 20 Messung.

b) Messung der Reduktase-Aktivität

Die Messungen wurden bei Raumtemperatur in 0,1 M

- 25 Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 durchgeführt, wobei die Absorptionszunahme bei 550 nm mit  $\epsilon = 8,9 \text{ mM}^{-1}$  (Fulco et al. 1992) gemessen wurde. 1 ml Probe enthielten 50 nmol Cytochrom c (aus Pferdeherz), 100 nmol NADPH und eine aus Tabelle 6 ersichtlichen Menge P450 BM-3. Als Referenz diente dieselbe Probe vor
- 30 NADPH-Zugabe. Die Lösungen wurden frisch bereitete und bis zur Benutzung am selben Tag auf Eis gelagert. Zur Messung der Reduktaseaktivität von P450 BM-3His<sub>6</sub> wurde zur Cytochrome-c-Lösung nach fünfminütiger Inkubation die NADPH-Lösung gegeben.

- 35 4. Protokolle zur Charakterisierung von P450 BM-3 und/oder P450 BM-3 F87A

Zur Messung der kinetischen Konstanten sowie der pH- und Temperaturstabilität wurde gereinigtes P450 BM-3 F87A verwendet.

- 40 Für alle anderen Bestimmungen wurde zentrifugierter und filtrierter klarer Rohextrakt verwendet. Für alle Experimente wurden pro Ansatz 0,05-0,2 nmol P450 BM-3 oder P450 BM-3 F87A in einem Gesamtvolumen von 1 ml und 8  $\mu\text{l}$  5-15 mM pNCA-Lösung verwendet. Mit Ausnahme der Lösungsmittelversuche wurden
- 45 Charakterisierungsexperimente in 1 ml Einweg-Plastikküvetten

durchgeführt. Sofern nicht anders beschrieben, wurden die Versuche bei Raumtemperatur durchgeführt.

a) Bestimmung der kinetischen Konstanten

5

Die kinetischen Konstanten wurden nach Zugabe von 792 µl Tris/HCl (pH 8,2, 0,2 M) und 100 µl P450 BM-3 zu 8 µl DMSO-Substratlösung unterschiedlicher Substratkonzentration ermittelt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion

10 durch Zugabe von 100 µl 1 mM NADPH-Lösung gestartet.

b) Lösungsmittelstabilität von P450 BM-3 F87A

Die Messung der Lösungsmittelstabilitäten erfolgte in 15 Glasküvetten (Hellma, Modell 6040), wobei Substrat statt in DMSO in Aceton, Dioxan, THF und Ethanol gelöst wurde. Die Bestimmungen wurden entsprechend der bei den kinetischen Messungen beschriebenen Vorschrift durchgeführt; jedoch wurde in 20 Unterschied dazu der Anteil des Puffers entsprechend der verwendeten Lösungsmittelmenge variiert.

c) pH-Stabilität und Temperaturstabilität von P450 BM-3 F87A

Die Messung der pH-Stabilität wurden bei 30°C im Stratagene 25 Robocycler (Modell gradient40) in dünnwandigen 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäßen (Stratagene) durchgeführt. Zu 0,1-0,2 nmol P450 BM-3 wurden 392 µl phosphatgepufferter Lösung (50 mM, pH 4-10) gegeben. Nach dem Inkubationszeitraum wurde die P450 BM-3 30 Lösung in eine Küvette überführt und 500 µl Tris/HCl (0,3 M, pH 8,2) und 8 µl 12-pNCA (6 mM) hinzugegeben. Nach fünfminütiger Inkubation wurde die Reaktion mittels 100 µl NADPH-Lösung (1 mM) gestartet. Die Temperaturstabilität wurde bei einem pH-Wert von 7,5 unter den gleichen Bedingungen wie die pH-Stabilität 35 untersucht.

d) Einfluß von Puffersalzkonzentrationen, Detergenzien, Proteaseinhibitoren, Thio-Verbindungen, Co(III)sepulchrat auf die P450 BM-3 F87A Aktivität

40 Die Auswirkungen dieser Verbindungen auf die P450 BM-3 F87A Aktivität sind in Analogie zu den kinetischen Untersuchungen durchgeführt worden, wobei ein variiertes Teil des Puffers durch die im selben Puffersystem gelöste Untersuchungssubstanz ersetzt 45 wurde.

e) Automatisierter Aktivitätsnachweis



Für den automatisierten Aktivitätsnachweis von P450 BM-3 F87A wurden Mikrotiterplatten mit 96 Reaktionskammern (Greiner Frickenhausen, Deutschland) gewählt. Das Gesamtreaktionsvolumen betrug 250 µl in einer Tris/HCl-Puffer (0,1 M, pH 8,2) mit 18  
5 nmol 10- und 11-pNCA, 12 nmol 12-pNCA oder 10 nmol 15-pNCA, die in 2,2 µl DMSO gelöst waren. Für die Pipettierarbeiten wurde eine Biomek2000 Pipettierroboter (Beckman Instruments, Fullerton, USA) verwendet. Nach fünfminütiger Inkubationszeit mit 0,02 nmol P450 BM-3 F87A wurde die Reaktion gestartet durch Einspritzen von 25  
10 µl einer wäßrigen NADPH Lösung (1 mM) in jede Reaktionskammer. In einem FluoStar-Mikrotiterplattenleser (BMG LabTechnology, Offenburg, Deutschland) wurde der Reaktionsablauf bei 405 nm absorptiv verfolgt.

#### 15 f) Wasserstoffperoxid-Untersuchungen

Für Aktivitätsuntersuchungen wurde verfahren wie für die kinetischen Messungen beschrieben, nur daß statt NADPH variierte wäßrige Wasserstoffperoxidsmengen zugegeben wurden.

20

Bei den Stabilitätsuntersuchungen wurden 0,05-0,1 nmol P450 BM-3 F87A in Abwesenheit von pNCA-Substrat mit variierten Wasserstoffperoxidsmengen fünf Minuten inkubiert. Nach Zugabe von Katalase (600 U) und einer weiteren fünfminütigen Inkubationszeit  
25 wurden zur Reaktionslösung 60 nmol 12-pNCA-Substrat pipettiert. Die Reaktion wurde fünf Minuten später durch Zugabe von 100 µl NADPH (1 mM) gestartet.

#### 30 g) Zn-Mediator-Untersuchungen

Die Reaktionen wurden in einer Schüttelapparatur für Eppendorf-Reaktionsgefäß-Schüttler (IKA-Labortechnik Vibrax mit Janke und Kunkel Aufsatz Typ VX2E) durchgeführt. Für  
35 Aktivitätsuntersuchungen wurde verfahren wie für die kinetischen Messungen beschrieben, nur wurden anstelle von NADPH variierte Mengen an Zink/Cobalt(III)sephalrat benutzt. Nach variierten Zeitintervallen wurden 100 µl Probe der Reaktionssuspension entnommen und in ein weiteres 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß  
40 pipettiert, in dem zum Reaktionsstop 10 µl KOH (6 M) vorgelegt waren. Nach einminütiger Zentrifugation bei 12000 g wurde der Überstand abgenommen und die Absorption bei 410 nm gemessen.

Beispiel 1: Klonierung, Expression und Reinigung von P450 BM-3 und Mutanten im Gramm-Maßstab

45

# 1. Klonierung des P450 BM-3 Gens und der Mutante P450 BM-3 F87A und deren Expression in 30-l-Fermentationen

Das P450 BM-3 Gen wurde mittels PCR aus der genomischen DNA von *Bacillus megaterium* isoliert, mit Tags versehen und wie in Figur 1 für die pT-Plasmide gezeigt, in die Expressionsvektoren pCYTEXP1 und pASK-IBA1CA kloniert. Zur Überprüfung der korrekten Insertion des P450 BM-3 Gens, der mit unterschiedlichen Tags versehen P450 BM-3 Varianten und zur Überprüfung der P450 BM-3 F87A Punktmutante wurden die Sequenzierprimer R0\_5 bis L7 verwendet. Für die PCR-Reaktionen nach dem Standard-Protokoll wurden für das Wildtyp-Enzym die Primer B1 und B2, für die P450 BM-3His<sub>6</sub> die Primer H1 und H2, für P450 BM-3Glu<sub>6</sub> die Primer G1 und G2, für P450 BM-3Arg<sub>6</sub> die Primer A1 und A2 und für P450 BM-3Strep die Primer S1 und S2 verwendet. Die Sequenzanalyse ergab keinerlei Mutationen für einen aus jeweils drei sequenzierten pT-USC0BM3- und pT-USC1BM3-Plasmiden. Für pT-USC2BM3 und pT-USC3BM3 wurde nur mit Primer R7 die korrekte Insertion des Tags überprüft. Der sequenzierte pA-USC4BM3-Klon zeigte zwei Mutationen im Reduktaseanteil des P450 BM-3 Proteins. Die Expressionsrate des mit einem His<sub>6</sub>-Tag versehen P450 BM-3 in DH5 $\alpha$  war mit Werten von 300 nmol pro Liter Fermenterbrühe um ca. 20 % höher als beim Wildtyp. Aufgrund dieser höheren Expressionsrate wurde pT-USC1BM3 zur Erhöhung der Sensitivität des pNCA-Tests an Position 87 durch Austausch eines Phenylalanins gegen Alanin mit den Stratagene QuikChange-Kit punktmutiert. Durch die PCR-Reaktion mit den Primern F87A1 und F87A2 enthält pT-USC1BM3F87A an der Mutationsposition ohne weitere Veränderung der Proteinsequenz eine zusätzliche EaeI-Restriktionsschnittstelle, die zur Selektion des zur Sequenzierung ausgewählten Klons verwendet wurde. Diese zusätzliche Restriktionsschnittstelle führt nach Restriktionsspaltung mit EaeI zum Auftreten einer neuen Bande bei ca. 800 bp in Spur 2 und einer gegenüber dem Wildtyp-Verdau in Spur 1 deutlich kleineren Bande bei 1,7 kbp. Nach Plasmidisolation wurden acht Klone mit EaeI verdaut (2  $\mu$ l EaeI-Puffer (10x), 1  $\mu$ l EaeI 3,2  $\mu$ l pT-USC1BM3, ad 20  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, 1 h bei 37°C). Ein Klon wurde sequenziert. Das pT-USC1BM3F87A Plasmid besitzt in der Linker-Region an Position 470 eine zusätzliche Mutation R470C. Auf eine Rückmutation wurde verzichtet aufgrund der Lokalisation der Mutation R470C am Ende der Linker-Region, die den P450-Anteil des P450 BM-3 mit dem Reduktaseanteil verbindet und keinerlei Einfluß auf die P450 BM-3 Aktivität zeigt.

## 2. Reinigung von P450 BM-3 und P450 BM-3 F87A

Ziel war es, eine kostengünstige, rasche und im präparativen Maßstab durchführbare Methode zur Reinigung von P450 BM-3 und P450 BM-3 F87A zu entwickeln. Dazu wurde ein Arg<sub>6</sub>-, His<sub>6</sub>-, Glu<sub>6</sub>- und Strep-Tag an das C-terminale Ende von P450 BM-3 angefügt. Auf der Basis des His<sub>6</sub>- und Strep-Tag sollten Affinitätsreinigungen und auf Basis des Arg<sub>6</sub>- und Glu<sub>6</sub>-Tags chromatographische Reinigungen mit Ionenaustauschern entwickelt werden. Ein Einfügen eines Tags an das N-terminale Ende des P450 BM-3 Gens wurde wegen der Lokalisation des

10

N-Terminus im Bereich des flexiblen Substrateingangskanals nicht in Betracht gezogen. Eine Modifikation in diesem Bereich würde mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer Änderung der P450 BM-3 Aktivität und Selektivität führen.

15

## 2.1 Proteinreinigungen mit Affinitätschromatographie

### a) P450 BM-3 mit His<sub>6</sub>-Tag

Bei der P450 BM-3His<sub>6</sub>-Reinigung über Metallchelatchromatographie binden mehr als 95 % der aufgetragenen 4 mg P450 BM-3 nicht an die 20 ml XK16/20-Affinitätssäule bei einem linearen 0-0,5 molaren Imidazolgradienten (10CV). Die chromatographische Reinigung mit Zn<sup>2+</sup>-Ionen wurde nach dem Pharmacia-Standardprotokoll durchgeführt. Das wenige aufgereinigte P450 BM-3 zeigte im NADPH-Assay keine Aktivität mehr. Die Ursache dieser Inhibierung konnte auf den Einfluß von Imidazol zurückgeführt werden. Imidazol bewirkt ein Ablösen des fünften Cysteinat-Liganden am katalytischen Häm-Zentrum. Diese Abdissoziation des fünften Liganden vom Häm-System führt zur sofortigen P450-Inaktivierung und zeigt sich im CO-Differenzspektrum durch eine charakteristische Verschiebung des Absorptionsmaximums von 448 nm nach 420 nm.

### 35 b) P450 BM-3 mit Strep-Tag

Zur Aufreinigung wurden 8,2 mg P450 BM-3Strep verwendet. Vergleichbar den Ergebnissen der His<sub>6</sub>-Tag Reinigungen zeigte P450 BM-3Strep keine Bindung an die Streptavidin-Affinitätsmatrix bei der Reinigung entsprechend dem READY TO USE KIT (IBA, Göttingen).

### c) P450 BM-3 mit Glu<sub>6</sub>-Tag

Ein Vergleich der linearen 0-1 M NaCl-Gradienten (12 CV, Tris/HCl Puffer (0,1 M, pH 8,0)) zeigte für P450 BM-3Glu<sub>6</sub> bei Verwendung von Super 650M- und DEAE 650M-Anionenaustauschern keine Unterschiede im Elutionsverhalten zum Wildtyp-Enzym.

5

#### d) Schlußfolgerungen

Die Ergebnisse der Reinigung von P450 BM-3 mit His<sub>6</sub>-, Glu<sub>6</sub>- und Strep-Tag lassen darauf schließen, daß das C-terminale Ende von P450 BM-3 nicht frei zugänglich an der Proteinoberfläche liegt und somit nicht für Reinigungszwecke verwendbar ist. Ferner verursachte im Falle des His<sub>6</sub>-Tags die Elution mittels Imidazol eine rasche Proteininaktivierung durch Verdrängung des fünften Liganden am Porphyrin-System.

15

#### 2.2 Anionenaustauschchromatographie

Um die Kosten zu minimieren, sollte eine effektive, kostengünstige und zeitsparende Reinigungsmethode für P450 BM-3 entwickelt werden, die eine einfache Maßstabsvergrößerung erlaubt. Als Methoden zur P450 BM-3 Reinigung standen nach den Ergebnissen der Reinigung von P450 BM-3 mit Tags somit noch nur HIC-Materialien und Ionenaustauscher zur Verfügung. Die Entscheidung fiel zugunsten der Anionenaustauscher, die in der Regel billiger sind und ein einfacheres Handling bieten.

##### a) Linearer und Stufengradient

Um eine Anionenaustauschchromatographiemethode zu entwickeln wurden vier unterschiedlich starke Anionenaustauschermaterialien DEAE 650S (35 µm), DEAE 650M (65 µm), SuperQ 650M (65 µm) und QAE 550M (65 µm) auf ihre Eignung hin untersucht. In ersten Experimenten wurde mit jedem Säulenmaterial ein 10-Säulen-Volumen (CV) langer linearer 0-1 M NaCl-Gradient zur Reinigung von 6-10 mg P450 BM-3 Rohextrakt in einem Tris/HCl-Puffer (0,1 M, pH 7, 8) aufgenommen. In allen Fällen betrug die Ausbeute 80-84 %. Die höchsten Proteinanteile im P450 BM-3 Elutionspeak zeigte das DEAE-Material, dicht gefolgt vom SuperQ- und QAE-Material.

Für die weitere Verbesserung der Auflösung mittels gestufter Salzgradienten war die Fähigkeit des ÄKTAexplorer-Systems hilfreich, gleichzeitig Leitfähigkeit und Absorption bei 280 nm und 417 nm aufzuzeichnen. Ein optimierter Zwei-Stufen-Salzgradient für die DEAE 650M Chromatographiesäule besitzt eine erste Stufe von 150 mM NaCl und eine zweite mit 250 mM NaCl. Die P450 BM-3 Elution beginnt, wie aus den Leitfähigkeitswerten des linearen NaCl-Salzgradienten ablesbar, bei einer Erhöhung der

NaCl-Konzentration von 150 mM auf 170 mM. Die minimale obere Salzstufe wurde zu 250 mM NaCl ermittelt; NaCl-Konzentrationen < 230 mM verursachen eine Verbreiterung des P450 BM-3 Elutionspeaks, und NaCl-Konzentrationen > 300 mM führen zu einem deutlich schlechteren Reinigungseffekt. Die Salzstufen wurden für die Chromatographiematerialien SuperQ 650M und QAE 550M in vergleichbarer Weise optimiert.

- Ein Vergleich des linearen DEAE 650M mit dem gestuften NaCl-Gradienten führt zu einer Erhöhung des P450 BM-3 Proteinanteils im Elutionspeak von 39 % beim linearen, auf 84 % beim gestuften Gradienten. Vergleichbare Ergebnisse wurden mit dem SuperQ 650M Chromatographiematerial erreicht; das QAE 550M Chromatographiematerial zeigte deutlich schlechtere Reinigungsergebnisse. Bei den gestuften Reinigungsmethoden lagen die Ausbeuten in allen Fällen bei > 78 %; die höchsten Ausbeuten von 93 % an P450 BM-3 im Elutionspeak wurden mit DEAE 650S erzielt.
- Beispiel 2: Entwicklung eines spektroskopischen Aktivitätsnachweises für P450 BM-3 und P450 BM-3 F87A

Ziel war es einen spektrometrischen oder fluorimetrischen Aktivitätsnachweis für P450 BM-3 zu entwickeln. Ein solcher Aktivitätsnachweis kann im Gegensatz zu Standardmethoden wie HPLC oder GC einfach automatisiert und somit zum Auffinden von weiteren P450 BM-3 Enzymvarianten verwendet werden.

Um einen neuen Aktivitätsnachweis für P450 BM-3 zu entwickeln, wurden verschiedene Verbindungen, die am terminalen C-Atom der Carbonsäuren das Chromophor tragen, synthetisiert und auf ihre Eignung untersucht.

Arbeiten von Oliver et al. Biochemistry (1997), 36(7):1567 zeigten für Laurinsäure und Myristinsäure als Substrat eine Verschiebung des Hydroxylierungsprofils von P450 BM-3 von subterminalen Positionen zur terminalen Position, falls Phenylalanin an Position 87 durch Alanin ersetzt wurde. Zur Erhöhung der Sensitivität der pNCA-Nachweismethode wurde diese Punktmutation, wie in Material und Methoden beschrieben, eingefügt und mittels Sequenzanalyse bestätigt.

#### 1. Nachweisprinzip

Figur 2 zeigt das Prinzip zu einem spektrometrischen Aktivitätsnachweis für terminal hydroxylierende Fettsäurehydroxylasen. Nach terminaler Hydroxylierung entsteht

ein instabiles Halbacetal, das in die  $\omega$ -Oxycarbonsäure und das spektrometisch detektierbare Chromophor dissoziiert.

## 2. Nachweis der P450 BM-3 F87A Aktivität mit PCA

5

### a) Synthese der Phenoxy-carbonsäuren (PCA)

Die PCA-Verbindungen wurden in einer einstufigen Synthese, wie in Referenzbeispiel 5 beschrieben, ausgehend von  $\omega$ -Bromcarbonsäuren synthetisiert. Die Synthesen gelangen in Gesamtausbeuten zwischen 76 und 78 %. Charakterisiert wurden die PCAs mittels  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  und Schmelzpunktbestimmung.

### b) Wahl der Reaktionsbedingungen

15

Um die Phenolbildung spektroskopisch nachweisen zu können, bietet es sich an, die Absorption im Wellenlängenbereich zwischen 250 und 280 nm zu messen (Luchter-Wasylewska 1996). Der geringe Extinktionskoeffizient am Absorptionsmaximum bei 274 nm von  $\epsilon=1090 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , das unterschiedliche Absorptionsverhalten von NADPH und  $\text{NADP}^+$  in diesem Wellenbereich und die Bildung von Wasserstoffperoxid in ungekoppelten Reaktionen verhinderten jedoch eine kontinuierliche spektroskopische Messung der Phenolbildung. Aus diesen Gründen wurde der Merck-Phenol-Nachweis Kit, zur Quantifizierung der Produktbildung verwendet. Mit NADPH als Cofaktor ergaben sich bei Verwendung der P450 BM-3 Mutante F87A für 12-PCA Umsatzgeschwindigkeiten von 640 eq/min und für 11-PCA von 410 eq/min.

## 30 3. Nachweis der P450 BM-3 und P450 BM-3 F87A Aktivität mit pNCA-Substraten

### a) Synthese der p-Nitrophenoxy-carbonsäuren (pNCA)

Die pNCA-Verbindungen wurden in einer neuen, dreistufigen Synthese, wie in Referenzbeispiel 5 beschrieben, ausgehend von  $\omega$ -Bromcarbonsäuren durch Veresterung, sich anschließender  $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion mit dem Natrium-p-Nitrophenolat und lipasekatalysierter Hydrolyse der Ester, synthetisiert. Die dreistufigen pNCA-Synthesen gelangen in Gesamtausbeuten zwischen 61 und 69 %. Charakterisiert wurden die pNCAs mittels  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  und Schmelzpunktbestimmung.

### b) Wahl der Reaktionsbedingungen

45

- In Figur 2 ist das Reaktionsprinzip der Umsetzung von pNCA-Substraten durch P450 BM-3 und P450 BM-3 F87A beschrieben. Für die Aktivitätsmessungen mußten pH-Wert und Wellenlänge des spektroskopischen Nachweissystems optimiert werden. Nur
- 5 deprotoniertes p-Nitrophenolat (pKs-Wert 7,1) trägt zur gelben Farbe bei; für die Nachweisempfindlichkeit wäre somit ein pH-Wert >9,1 (>99 % deprotoniert) empfehlenswert. Die pNCA-Verbindungen sind in stark alkalischen Lösungen stabil, im Gegensatz zum P450 BM-3 Protein, das bei pH 10 und 30°C innerhalb von 5 min 80 %
- 10 seiner Aktivität verliert. Als Kompromiß zwischen Proteinstabilität und Sensitivität der Nachweismethode wurde ein pH-Wert von 8,1 bis 8,2 gewählt. Berechnungen auf der Basis der Henderson-Hasselbalch-Gleichung zeigen, daß in diesem pH-Bereich 90-92 % des umgesetzten p-Nitrophenols deprotoniert sind und zur
- 15 gelben Farbe beitragen. Das Absorptionsmaximum von p-Nitrophenolat liegt bei 400 nm. Bei dieser Wellenlänge absorbieren jedoch auch das Häm-Zentrum und der Cofaktor NADPH. P450 BM-3 besitzt ein starkes Absorptionsverhalten zwischen 350 und 450 nm, das in Abhängigkeit von Substratbindung und
- 20 Oxidationsstufe des Eisens im katalytischen Zentrum stark schwankt. Das Absorptionsspektrum von NADPH begrenzt den Wellenlängenbereich auf >390 nm. Die Wellenlänge 410 nm wurde aufgrund der Reproduzierbarkeit letztendlich zur Aktivitätsmessung ausgewählt. Falls die Sensitivität des
- 25 Nachweissystems nicht ausreichend ist, sollte bei Wellenlängen im Bereich von 400 nm gearbeitet werden. Unter den gewählten Nachweisbedingungen (pH 8,2, 410 nm) wurde der Extinktionskoeffizient bestimmt zu  $\epsilon = 13200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .
- 30 pNCAs besitzen nur eine geringe Wasserlöslichkeit, so daß ein Lösungsvermittler benötigt wird. Dazu kann DMSO ohne Beeinflussung der P450 BM-3 F87A Aktivität bis zu Konzentrationen von 1 % (v/v) zugegeben werden. 0,8 % (v/v) DMSO wurden deshalb als Lösungsvermittler im Aktivitätsnachweissystem verwendet.
- 35 Der Zeitbedarf des pNCA-Nachweissystems hängt stark von der verwendeten Enzymmenge ab. Falls nmol-Mengen an P450 BM-3 F87A im pNCA-Aktivitätsnachweis eingesetzt wurde, war 1 min zum Aktivitätsnachweis ausreichend.
- 40
- c) Automatisierung des pNCA-Nachweises
- Für den Einsatz in einer HTS-Umgebung wurde der pNCA-Aktivitätsnachweis unter Benutzung einer Biomek2000
- 45 Arbeitsstation und eines BMG FluoStar Mikrotiterplattenleser automatisiert. Unter Verwendung von P450 BM-3 und der Mutante F87A wurde in jeweils 16 Messungen mit den pNCA-Substraten 10-,

11-, 12- und 15-pNCA die Reproduzierbarkeit des Assaysystems untersucht. Bei den Gesamtaborptionen gab es aufgrund von Pipettierungenauigkeiten Unterschiede um den Faktor zwei bis vier, die Reaktivitätsunterschiede schwankten jedoch nur zwischen 5 2 und 6 %. Die beste Reproduzierbarkeit wurde für die P450 BM-3 F87A Mutante erzielt mit Abweichungen ~ 2 % und die schlechteste für den Wildtyp und 15-pNCA mit Abweichungen von bis zu 6 % vom Mittelwert aller Messungen. Ursächlich für die Genauigkeitsunterschiede sind die unterschiedliche Löslichkeit 10 der pNCA-Substrate und verschiedene Umsätze in Abhängigkeit von der Kettenlänge.

Die F87A Mutante setzt 12-pNCA vollständig um, während das Wildtyp-Enzym nach 33 % stoppt. Die Ursache liegt vermutlich in 15 subterminal hydroxylierten 12-pNCA-Verbindungen, die nicht mehr oder nur noch langsam weiter umgesetzt werden. Für P450 BM-3 und P450 BM-3 F87A sind das pNCA-Kettenlängenprofil und der Umsatz aus  $\omega$ -Hydroxylierung der pNCAs, berechnet aus dem Quotienten von beobachteten zu gemessener Gelbfärbung der Lösung in den 20 folgenden Tabellen 4 und 5 zusammengefaßt. Zusätzlich wurden für P450 F87A die kinetischen Daten aus den Lineweaver-Burk-Diagrammen ermittelt.

Tabelle 4

25

30	Ketten- länge der pNCA- Verbin- dung	P450 BM-3 F87A $k_{cat}$ [eq <sup>a</sup> /min]	P450 BM-3 F87A $\omega$ -Hydroxylie- rungsprodukte [%]	P450 BM-3 Wildtyp $k_{cat}$ [eq <sup>a</sup> /min]	P450 BM-3 Wildtyp $\omega$ -Hydroxylie- rungsprodukte [%]
	6	nicht umgesetzt	nicht umgesetzt	nicht umgesetzt	nicht umgesetzt
35	8	1	<1	2	<1
	10	426	94	322	98
	11	204	64	267	63
	12	574	100	114	33
	15	680	61	246	35

a anstatt des Ausdrucks nmol (Substrat)/nmol (P450) wird Equi-  
valente (eq) verwendet 40

45



Tabelle 5

5	Kettenlänge der pNCA- Verbindung	P450 BM-3 F87A $k_{cat}$ [eq <sup>a</sup> /min]	$K_m$ [mM]	$k_{cat}/K_m$ [M <sup>-1</sup> *min <sup>-1</sup> ]
	10	426 ± 32	42 ± 8	1.0*10 <sup>7</sup>
	11	204 ± 18	69 ± 7	3.4*10 <sup>5</sup>
	12	574 ± 47	6,2 ± 0,3	1.1*10 <sup>4</sup>
10	15	680	-	-

a anstatt des Ausdrucks nmol (Substrat)/nmol (P450) wird  
Equivalente (eq) verwendet

### 15 Beispiel 3: Neues Cofaktor-System für P450 BM-3 und P450 BM-3 F87A

Ein Haupthindernis der industriellen Nutzung von P450-Systemen  
sind die Kosten, die der Cofaktor NADPH verursacht. Zur Lösung  
20 des Kostenproblems wurde ein alternatives Cofaktor-Konzept  
entwickelt, bei dem NADPH durch Zink und den Mediator  
Cobalt(III)sepulchrat ersetzt wurde; Zink dient als  
Elektronenquelle und Cobalt(III)sepulchrat als  
Elektronentransportsystem vom Zink zum P450 BM-3.

25

#### 1. Nachweis der Reduktion von Cobalt(III)sepulchrat durch Zink

Cobalt(III)sepulchrat besitzt unter Standardbedingungen ein  
Normalpotential von -0,54 V gegen eine Kalomel-Elektrode  
30 (Creaser et al., J. Am. Chem. Soc. (1977) 99: 3181). Es läßt  
sich, wie in Abbildung 3 gezeigt, mittels Zn-Staub in einem  
Tris/HCl-Puffer (0,2 M, pH 8,2) innerhalb von Sekunden  
reduzieren. In Gegenwart von Luftsauerstoff in wäßrigen Lösungen  
wird es innerhalb weniger Minuten wieder zu Cobalt(III)sepulchrat  
35 oxidiert.

#### 2. Nachweis der P450 BM-3 F87A Aktivität mit alternativem Cofaktor-System

##### 40 2.1 pNCA-Assay

Figur 4 zeigt die Umsetzung von 12-pNCA mittels des  
Zn/Cobalt(III)sepulchrat/P450 BM-3 F87A Systems. Bei einem  
Absorptionsmaximum von 0,8 nach 8 min zeigt das  
45 Zn/Cobalt(III)sepulchrat/P450 BM-3 F87A System eine gelbe Farbe,  
die einem 70%igen Umsatz entspricht. Innerhalb von 20 min  
verschwindet die durch p-Nitrophenolat verursachte gelbe Farbe

völlig; der Restabsorptionswert von 0,15 stammt vom Mediator. Kontrollexperimente zeigten, daß Zn-Pulver die Nitrogruppe von *p*-Nitrophenolat im Tris/HCl-Puffer (pH 8,2, 50 mM, 0,25 M KCl) reduziert. Weitere Kontrollexperimente zeigten, daß

5 Wasserstoffperoxid keinen oxidativen Einfluß auf *p*-Nitrophenolat und pNCAs hat.

In Figur 5 sind die beschriebenen Elektronentransferwege von Zn über den Mediator zum P450 BM-3 und der Substratumsetzung unter

10 Berücksichtigung des verkürzten Wasserstoffperoxid-Reaktionswegs ("shunt-pathway") dargestellt.

## 2.2 PCA-Assay

15 Aufgrund der Reduktion von *p*-Nitrophenol durch Zink in einem Tris/HCl-Puffer wurde 12-pNCA durch 12-PCA ersetzt. Der Phenolnachweis erfolgte mittels des Merck-Phenolnachweis-Kits bei 495 nm. Ein direkter photometrischer Phenolnachweis bei 274 nm ist aufgrund des Absorptionsverhaltens des oxidierten und

20 reduzierten Cobalt(III)sepulchrat nicht möglich. Figur 6 verdeutlicht für 12-PCA als Substrat eine im Vergleich zu 12-pNCA langsame Entfärbung (Figur 4). Als Ursache für die Absorptionsabnahme konnte Wasserstoffperoxid identifiziert werden, das durch reduziertes Cobalt(II)sepulchrat in

25 Nebenreaktionen durch Reduktion von Luftsauerstoff in wäßrigen Lösungen gebildet wird. Ferner tritt Wasserstoffperoxid-Bildung bei P450-Systemen infolge von ungekoppelten Reaktionen als Nebenreaktionsprodukt immer auf. Aus letzterem Grund wurde eine weitere Optimierung der PCA-Reaktionsbedingungen nicht weiter

30 verfolgt.

In Gegenwart von 600 U Katalase erfolgt, wie in Figur 6 gezeigt, die Absorptionsabnahme bei 495 nm deutlich langsamer.

## 35 3.1 Pufferzusammensetzung

Um die Entfärbung der Lösung durch die Reduktion von *p*-Nitrophenolat mittels Zink zu vermeiden, wurde zunächst erfolglos die KCl-Konzentration und der pH-Wert im Rahmen der

40 P450 BM-3 F87A Stabilität variiert (6,5-8,5). Erfolgreich, wie in Figur 7 gezeigt, kann die Reduktion von *p*-Nitrophenol durch Zink mittels Zusätzen an Kaliumphosphat-Puffer verhindert werden. Ab einem Kaliumphosphatanteil  $\geq 10$  % wird *p*-Nitrophenol nur noch in geringem Ausmaß ( $\leq 10$  %) durch Zn reduziert und bei einer 1:1

45 Mischung ist selbst nach 14 h keine weitere Reduktion mehr feststellbar (nicht abgebildet). Wie in Figur 7 gezeigt, verringert sich der Anteil an reduziertem Co(II)sepulchrat im

Mischungsbereich bis zu 20 % Kaliumphosphat zunächst deutlich um ca. -25 %, um dann zwischen 20 und 70 % (v/v) Kaliumphosphat-Anteil konstant zwischen 60 bis 70 % zu verharren. Die im Vergleich zum Tris/HCl-Puffersystem geringere

- 5 Verfügbarkeit an reduziertem Cobalt(II)sepulchrat führt zu einem Aktivitätsverlust von ca. 15 %.

Aus obigen Ergebnissen wurde für die weiteren Optimierungen eine 1:1 Mischung beider Pufferlösungen verwendet.

10

### 3.2 Einfluß der Mediatorkonzentration auf den Umsatz und die P450 BM-3 F87A Aktivität

- Figur 8A zeigt den Einfluß des Cobalt(III)sepulchrat Mediators auf die P450 BM-3 Aktivität im NADPH-Assay bei variierten Mediatorkonzentrationen. Bei Cobalt(III)sepulchrat-Konzentrationen  $\geq 5$  mM bildete sich während des Reaktionsablaufs ein kolloidaler Niederschlag, der vor Absorptionsmessung mittels Zentrifugation abgetrennt wurde. Für Umsetzungen mit dem Zink/Cobalt(III)sepulchrat-System ist eine optimale Cobalt(III)-sepulchrat-Konzentration im Bereich von 0,5-0,75 mM pro 0,072 nmol P450 BM-3 F87A vorhanden. Wie in Figur 8B gezeigt, inhibiert Cobalt(III)sepulchrat bis zu Konzentrationen  $\leq 0,5$  mM P450 BM-3 F87A selbst in Abwesenheit von Substrat nur geringfügig. Der Inhibierungsgrad bleibt bei variierten Inkubationszeiten konstant und hängt nur vom Konzentrationsverhältnis Cobalt(III)sepulchrat zu P450 BM-3 F87A ab.

### 3.3 Zn-Konzentration

30

- Die Abhängigkeit des Umsatzes von 0,072 nmol P450 BM-3 F87A von der eingesetzten Zinkpulvermenge ist in Figur 9 gezeigt. Ein optimaler Umsatz wurde im Bereich von 20 bis 40 mg Zink pro Milliliter Reaktionslösung erzielt. Für die Umsatzrückgänge bei 50 und 100 mg war vermutlich eine abnehmende Sauerstoffkonzentration in der Reaktionslösung durch zunehmende mediatorskatalysierte Wasserstoffperoxidbildung verantwortlich.

- Ein Ersatz von Zinkpulver durch Zinkgranalien führte selbst bei Verwendung von 100fach erhöhten Mengen nur zu sehr geringen Umsatzgeschwindigkeiten (Faktor  $>20$  geringer).

### 3.4 Einfluß der $H_2O_2$ -Konzentration

- 45 Um den Anteil den Wasserstoffperoxid über den 'shunt' Reaktionsweg zur 12-pNCA-Umsetzung durch P450 BM-3 F87A beiträgt, zu bestimmen, wurden 12-pNCA und P450 BM-3 F87A mit

variieren Wasserstoffperoxid-Konzentrationen inkubiert. Im Bereich von 8-20  $\mu\text{M}$  Wasserstoffperoxid wird bei vergleichbaren P450 BM-3 F87A Aktivitäten nach einer Minute bei einem 20-25%igen Umsatz eine Plateau erreicht, unabhängig von der Wasserstoffperoxid-Konzentration. Die weitere Zugabe von NADPH im Überschuß (100  $\mu\text{M}$ ) zeigt, daß P450 BM-3 F87A durch Wasserstoffperoxid nicht vollständig inaktiviert wird. Die Restaktivitäten sind bei geringen Wasserstoffperoxid-Konzentration hoch und sinken mit zunehmender Wasserstoffperoxid-Konzentration (nicht gezeigt).

Um die Stabilität von P450 BM-3 gegenüber Wasserstoffperoxid zu bestimmen, wurde P450 BM-3 F87A in Abwesenheit von Substrat (12-pNCA) 5 min mit varierten Wasserstoffperoxid-mengen inkubiert. Nach Zugabe von Katalase (600 U) und 60 nmol Substrat wurden die Umsatzgeschwindigkeiten unter Verwendung von NADPH als Elektronendonator bestimmt.

Wie in Figur 10 gezeigt, inhibieren in Abwesenheit von Substrat bereits Wasserstoffperoxid-Konzentrationen im 5  $\mu\text{M}$ -Bereich die P450 BM-3 F87A Aktivität deutlich. Als Konsequenz ergibt sich hieraus für einen P450 BM-3 F87A Enzym-Membran-Reaktor, bei möglichst hohen Substratkonzentrationen zu arbeiten und die Wasserstoffperoxidbildung durch Katalase- oder Anti-Oxidant-Zugabe zu minimieren.

#### Beispiel 4: Aktivitätstest mit weiteren P450 BM-3 Mutanten

Analog Beispiel 2 wurden weitere BM-3 Mutanten sowie das Wildtyp-Enzym (WT) auf Aktivität gegenüber pNCA-Derivaten verschiedener Kettenlänge getestet. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle 6 zusammengefasst:

Tabelle 6

Spezifische Aktivität einzelner P450 BM-3 Mutanten für pNCAs verschiedener Kettenlänge

	WT	F87A	L188K	V26T	R47F	S72G	A74G	M354T
15-pNCA	405 <sup>1</sup>	410	288	519	258	439	474	560
12-pNCA	141	284	316	555	233	596	517	480
10-pNCA	339	92	207	106	52	150	103	171
8-pNCA	15	2	69	16	13	3	6	4

<sup>1</sup> Spezifische Aktivität: nmol/min/nmol P450.

## Patentansprüche

1. Elektronendonorsystem für die Übertragung von Elektronen auf  
5 Enzyme mit Redox-Eigenschaften, dadurch gekennzeichnet, daß das System eine anorganische, nicht elektrodengebundene Elektronenquelle und einen Mediator umfaßt, der zur Übertragung von Elektronen von der Elektronenquelle auf das Enzym befähigt ist.
- 10 2. Elektronendonorsystem nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym ein Cytochrom P450-haltiges Enzym ist.
- 15 3. Elektronendonorsystem nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym eine Monooxygenase (E.C. 1.14.--.) ist.
- 20 4. Elektronendonorsystem nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Mediator ein Standard-Normalpotential im Bereich von weniger als etwa -0,4 V besitzt.
- 25 5. Elektronendonorsystem nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Mediator ausgewählt ist unter Kobalt(III)sepulchrat, Methylviologen, Neutralrot, Riboflavin, Rutheniumtriacetat, FMN und FAD.
- 30 6. Elektronendonorsystem nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektronenquelle ein Metall mit einem niedrigeren Standard-Normalpotential als der Mediator ist.
- 35 7. Elektronendonorsystem nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektronenquelle metallisches Zink ist.
- 40 8. Elektronendonorsystem, nach einem der vorhergehenden Ansprüche, ausgewählt unter den Systemen:
  - Zn/Kobalt(III)sepulchrat und
  - Zn/Neutralrot.
- 45 9. Verfahren zur enzymatischen Übertragung von Sauerstoff auf ein Kohlenwasserstoff-haltiges Wasserstoffdonor-Molekül, dadurch gekennzeichnet, daß man das Wasserstoff-Donormolekül in

einem Reaktionsmedium, umfassend das Sauerstoff-übertragenden Enzym und ein Elektronendonorsystem nach einem der Ansprüche 1 bis 8, in Gegenwart von Sauerstoff unter Reaktionsbedingungen inkubiert.

5

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Wasserstoff-Donormolekül ausgewählt ist unter Verbindungen der Formel



10

worin

R für einen Alkylrest mit 8 oder mehr Kohlenstoffatomen steht, und

15

X für eine polare, zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken befähigte Gruppe, vorzugsweise eine Carboxy-, Amid-, Nitril-, Sulfat-, Sulfon-, Amin- oder Hydroxygruppe, steht.

20

11. Verfahren zur enzymatischen Herstellung terminal oder subterminal (Position  $\omega$ -1 bis  $\omega$ -4) hydroxylierter Fettsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß man

25

a) eine hydroxylierbare Fettsäure oder Fettsäurederivat in Gegenwart eines Elektronendonorsystems nach einem der Ansprüche 1 bis 8 mit einer Cytochrom P450 Monooxygenase und Sauerstoff umsetzt; und

30

b) das (die) hydroxylierte(n) Produkt(e) isoliert.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das  $\omega$ -hydroxylierbare Fettsäurederivat ausgewählt ist unter terminal gesättigten, verzweigten oder unverzweigten Fettsäuren mit mehr als 10 Kohlenstoffatomen, insbesondere  $C_{12}$  -  $C_{30}$ -Fettsäuren.

35

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym eine Cytochrom P450 Monooxygenase ist, ausgewählt unter:

40

a) dem aus *Bacillus megaterium* (DSM 32T) isolierbaren Wildtypenzym; oder

45

- b) einer durch Aminosäuresubstitution in wenigstens einer der Positionen 26, 47, 72, 74, 87, 188 und 354 erhältlichen Mutanten des Wildtypenzyms (SEQ ID NO:35).
- 5 14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß eine Einfachmutante eingesetzt wird, die ausgewählt ist unter F87A, F87V, L188K, V26T, R47F, S72G, A74G und M354T.
- 10 15. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Mutante in Position 87 die Mutation F87A oder F87V und wenigstens eine weitere der folgenden Mutationen aufweist: L188K, A74G, R47F und V26T.
- 15 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß das Elektronendonorsystem Zink/Co(III)sepulchrat ist.
- 20 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß man zumindest Stufe a) in Gegenwart von Chloridionen durchführt.
- 25 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß man zumindest Stufe a) in Gegenwart eines Wasserstoffperoxyd-spaltenden Enzyms durchführt.
- 30 19. Bioreaktor zur Verwendung bei der Herstellung  $\omega$ -hydroxylierter Fettsäuren, gekennzeichnet durch immobilisierte Monooxygenase und ein Elektronendonorsystem nach einem der Ansprüche 1 bis 8 im flüssigen Reaktionsmedium.
- 35 20. Nachweisverfahren für Fettsäure-Monooxygenasen, dadurch gekennzeichnet, daß man
- 40 a) einen Analyten, in dem man Enzymaktivität vermutet, mit einer  $\omega$ -hydroxylierbaren Fettsäure oder Fettsäurederivat, welche(s) einen terminalen, abspaltbaren Chromophor oder Fluorophor trägt, in Gegenwart eines Elektronendonorsystems nach einem der Ansprüche 1 bis 8 inkubiert; und
- 45 b) die Abspaltung des Chromophors oder Fluorophors qualitativ oder quantitativ bestimmt.

21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß man die Umsetzung in Gegenwart eines Wasserstoffperoxyd-spaltenden Enzyms und gegebenenfalls in Gegenwart von Chloridionen durchführt.

5

22. Testkit, umfassend ein Elektronendonorsystem nach einem der Ansprüche 1 bis 8.

10

15

20

25

30

35

40

45



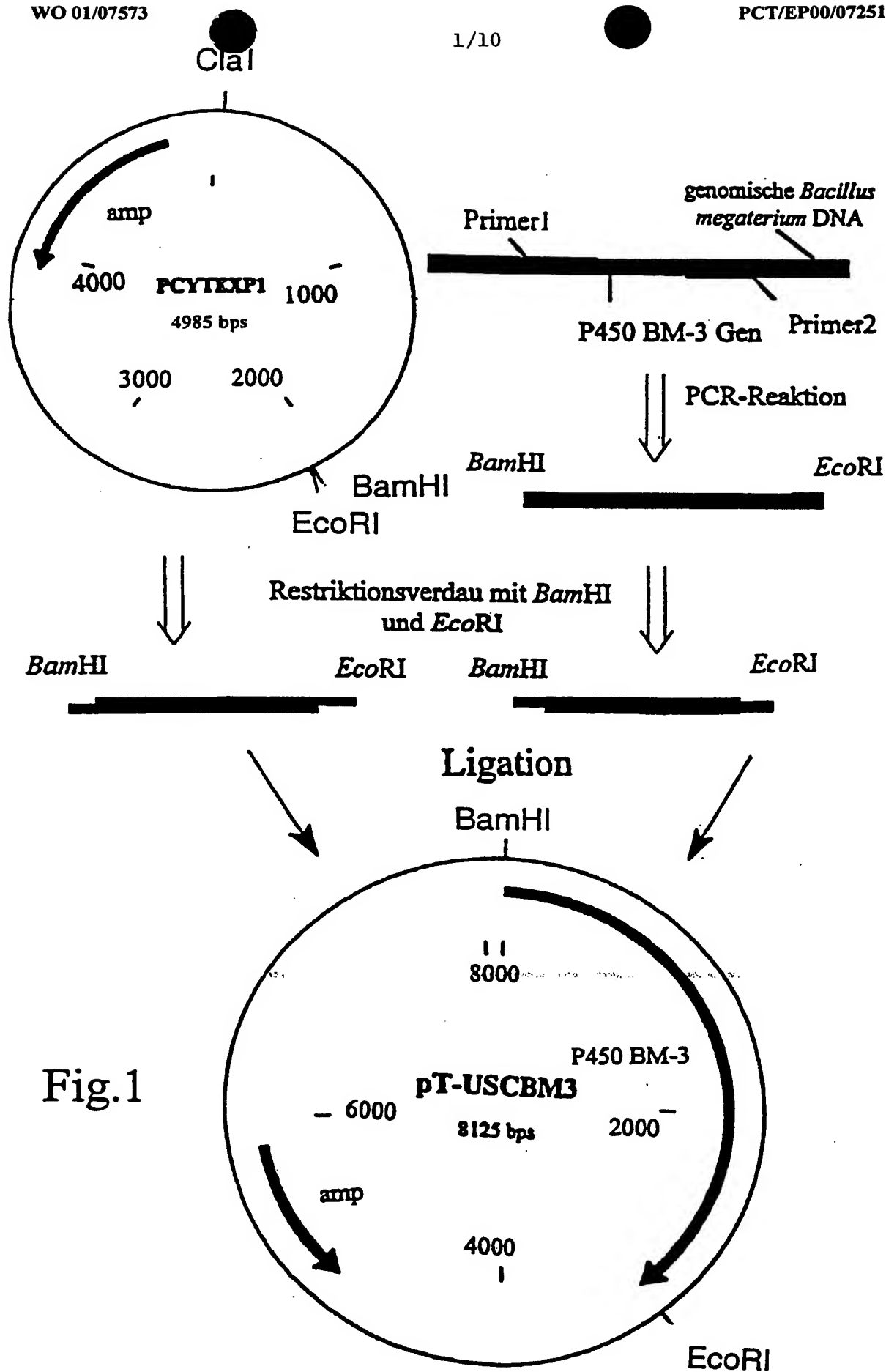


Fig.1

**BEST AVAILABLE COPY**

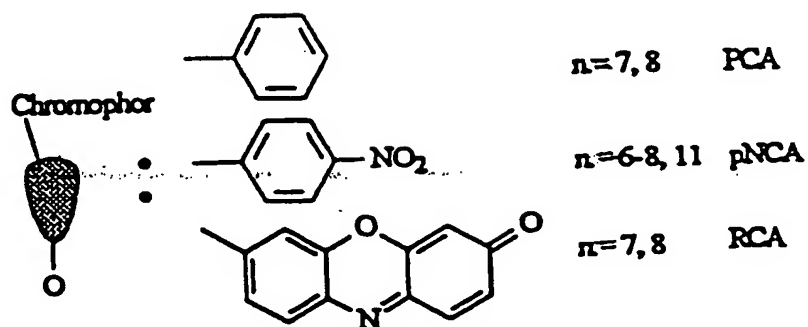
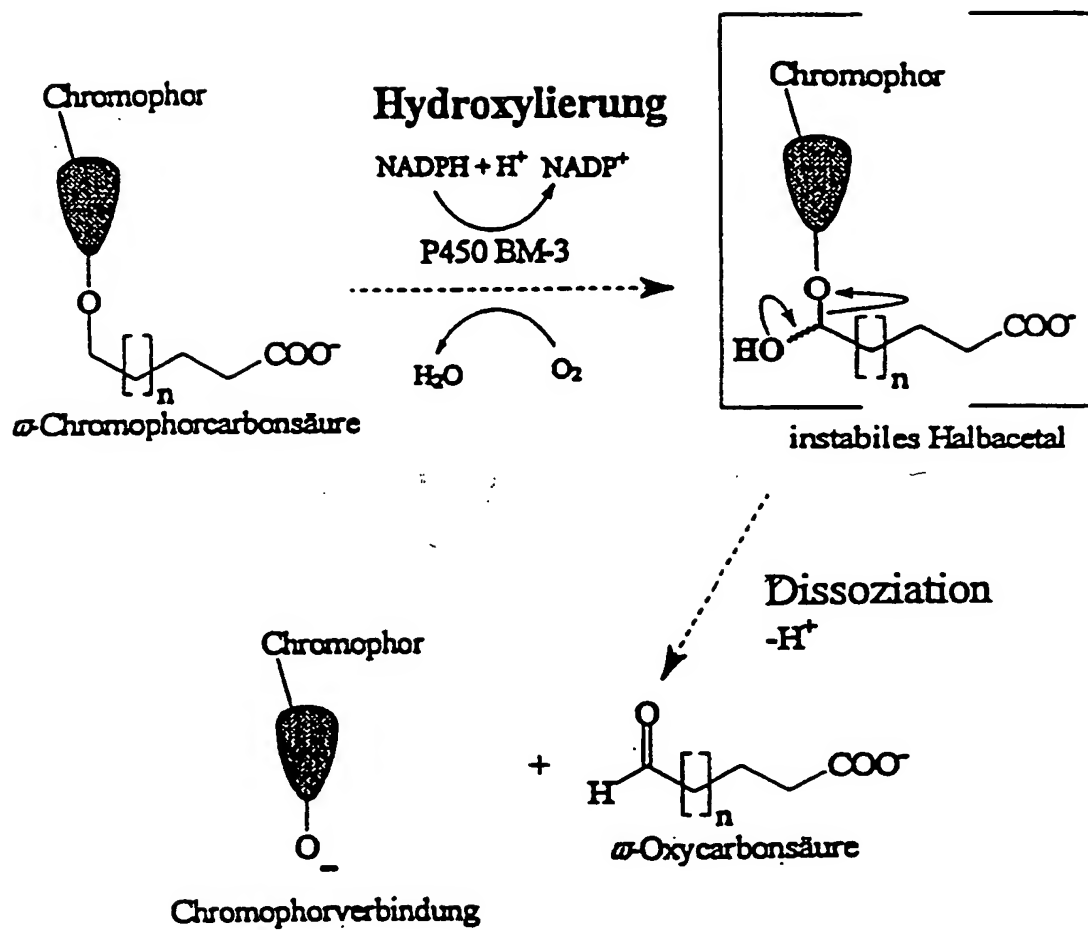


FIG.2

**BEST AVAILABLE COPY**

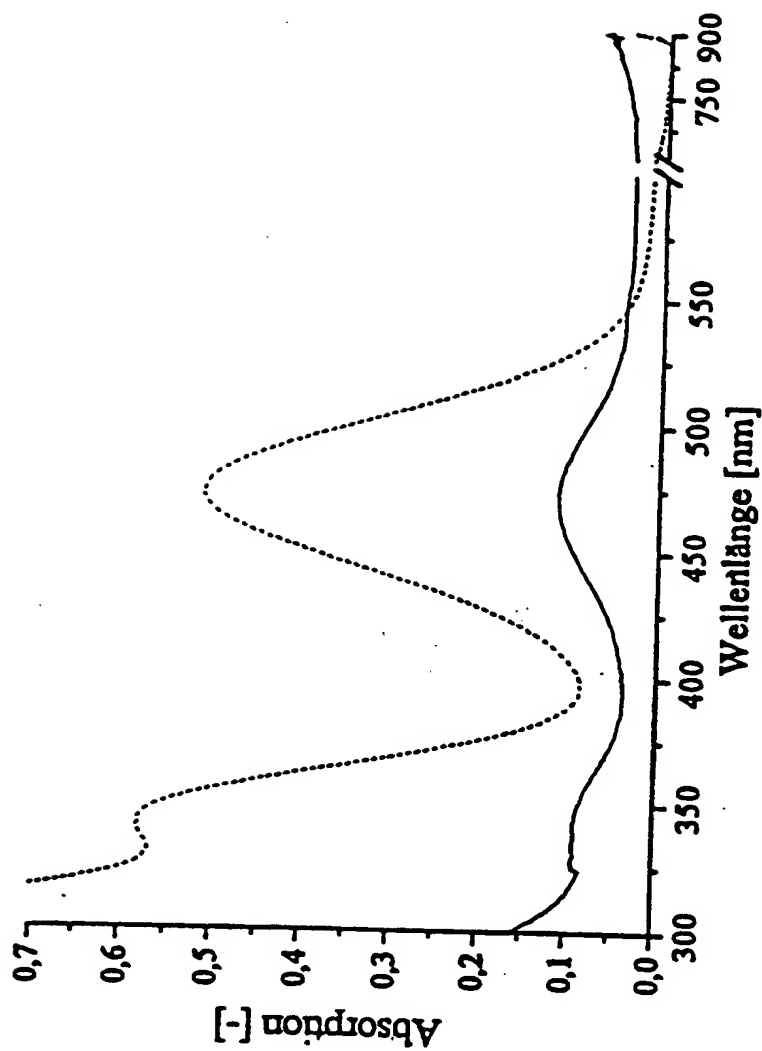


Fig.3

**BEST AVAILABLE COPY**

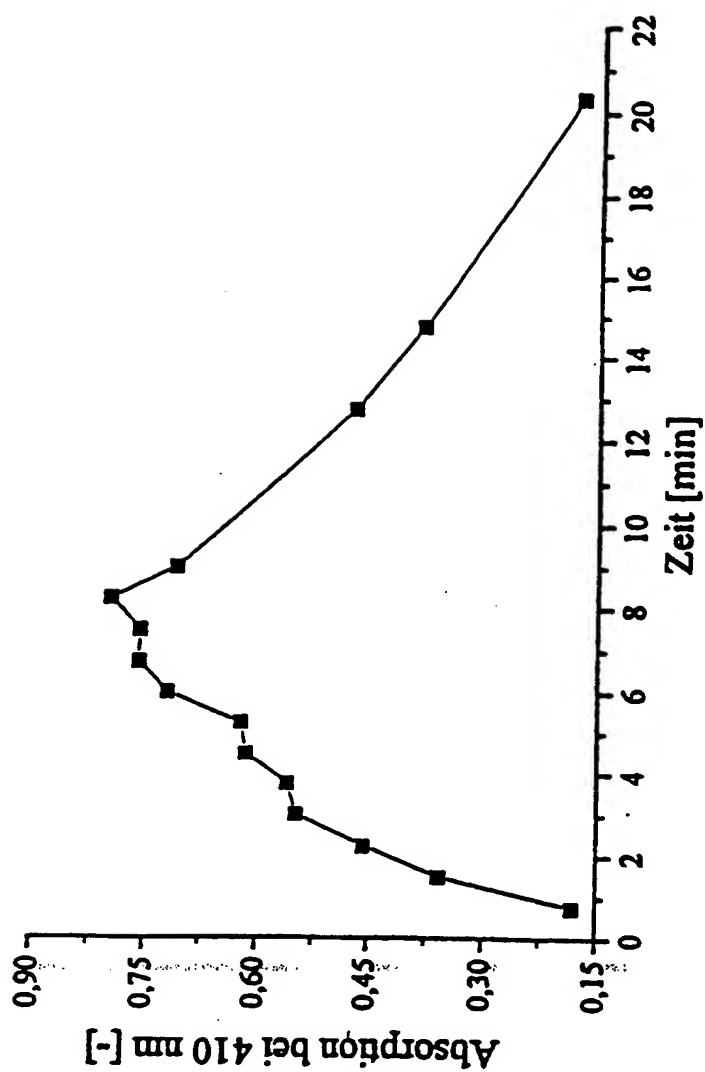


Fig.4

**BEST AVAILABLE COPY**



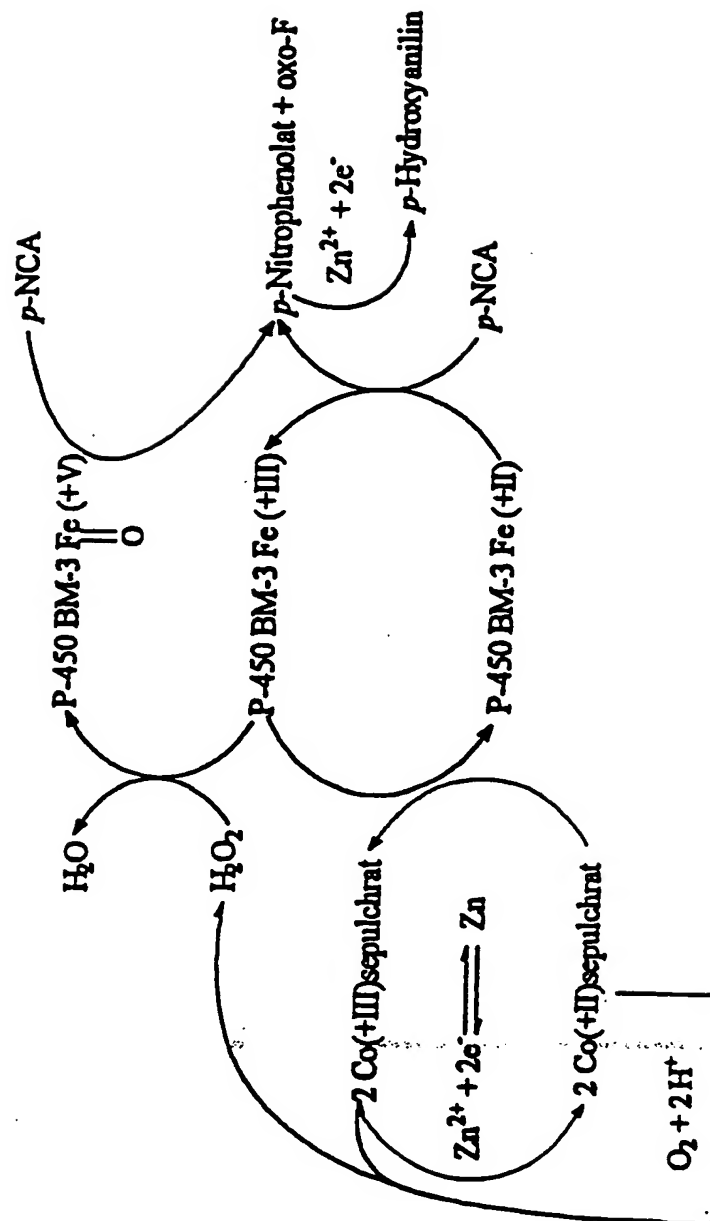


Fig.5

**BEST AVAILABLE COPY**

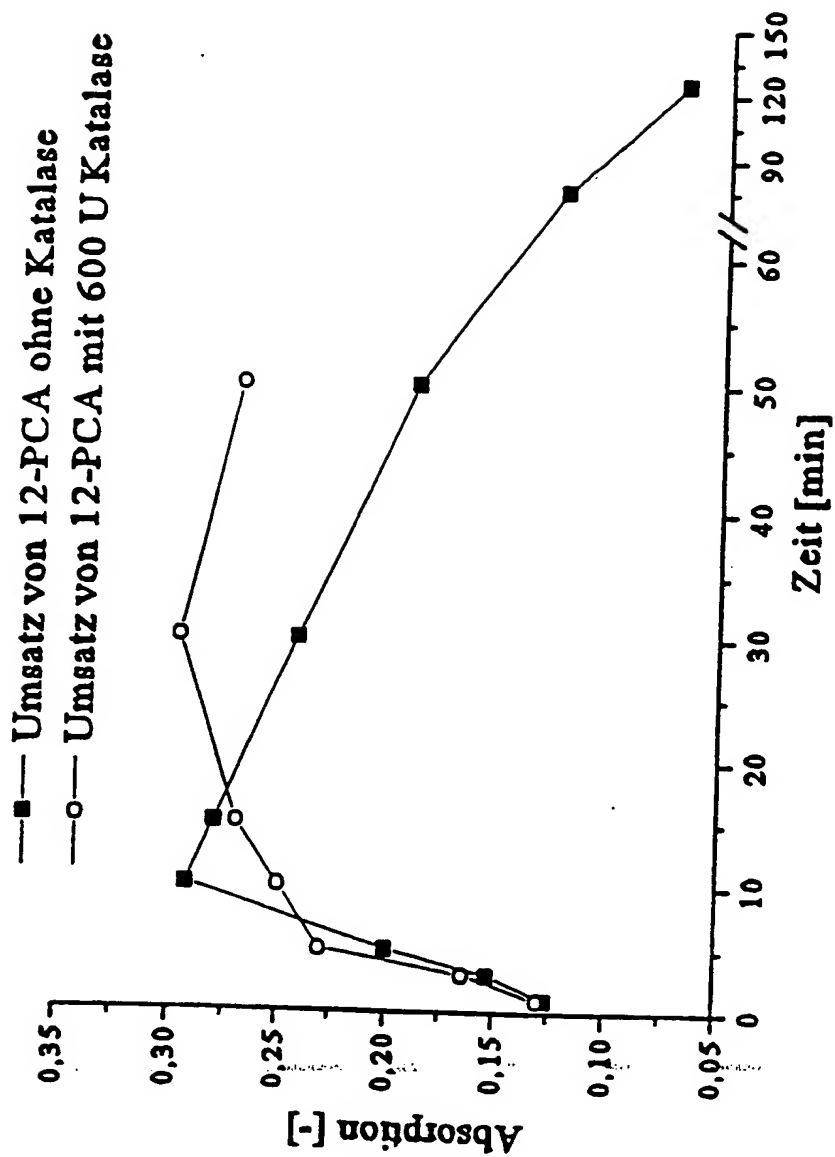
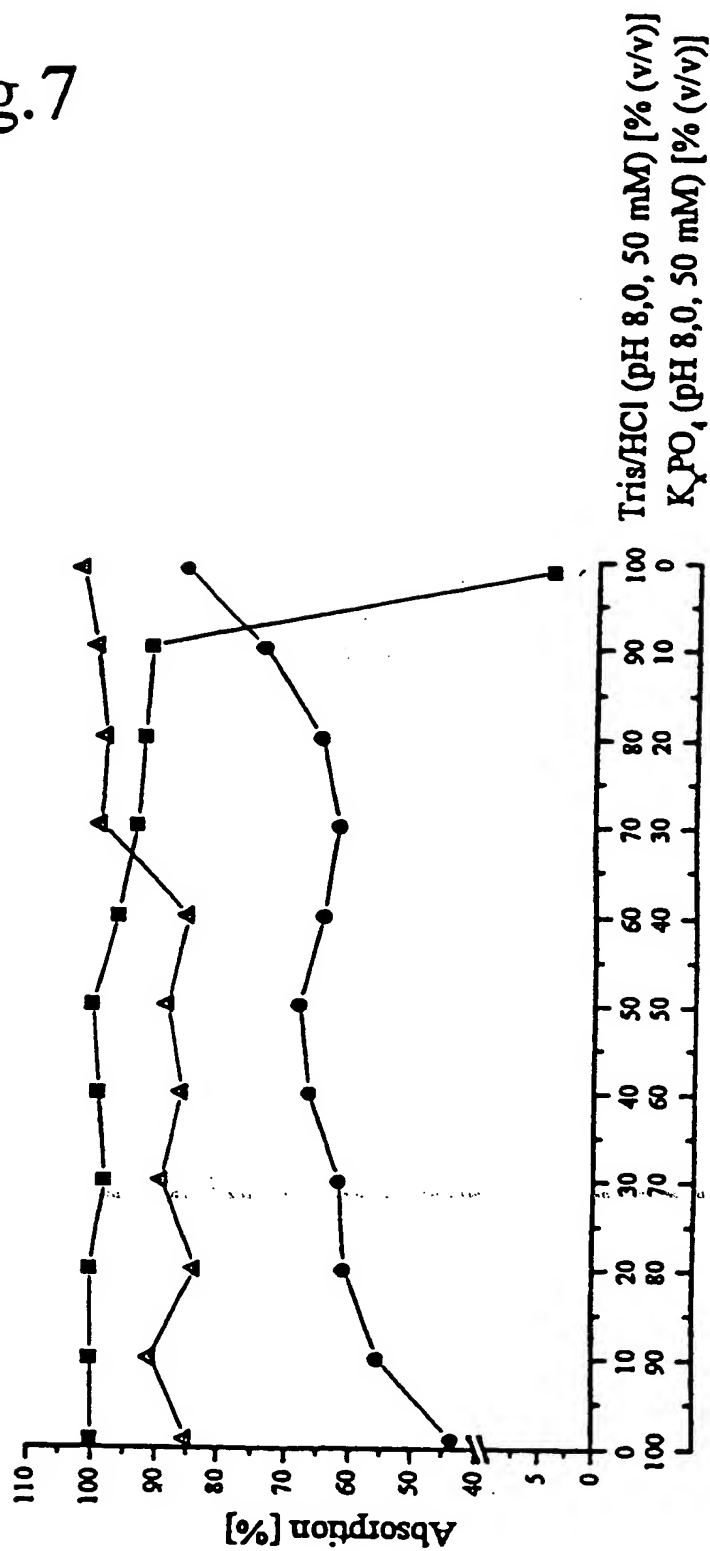


Fig.6

**BEST AVAILABLE COPY**

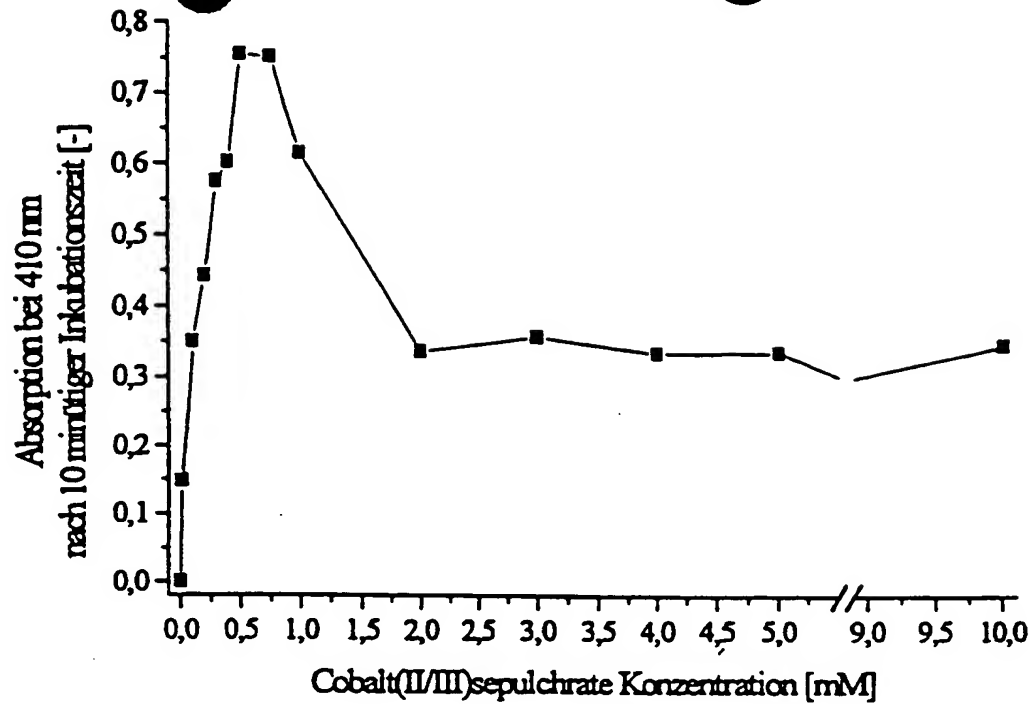
Fig. 7

—■— Einfluß des Puffers auf *p*-Nitrophenol-Reduktion  
 —●— Einfluß des Puffers auf Cobalt(II)sepulchrate-Reduktion  
 —▲— Einfluß des Puffers auf die 12-pNCA/P450 BM-3 F87A Aktivität



**BEST AVAILABLE COPY**

A



B

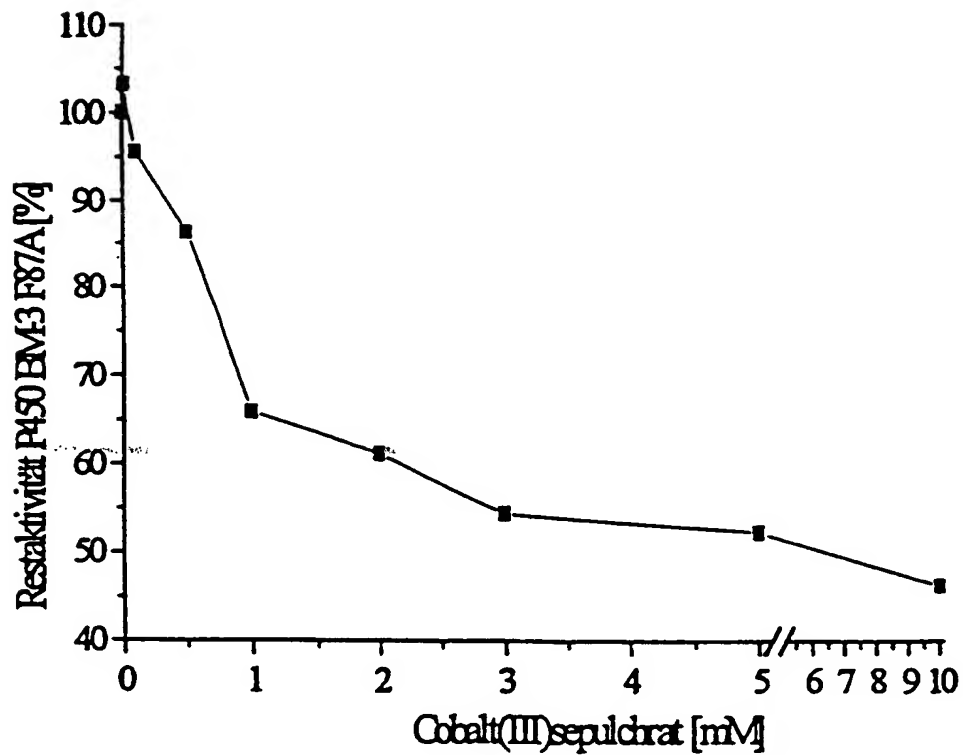


Fig.8

**BEST AVAILABLE COPY**

**BEST AVAILABLE COPY**



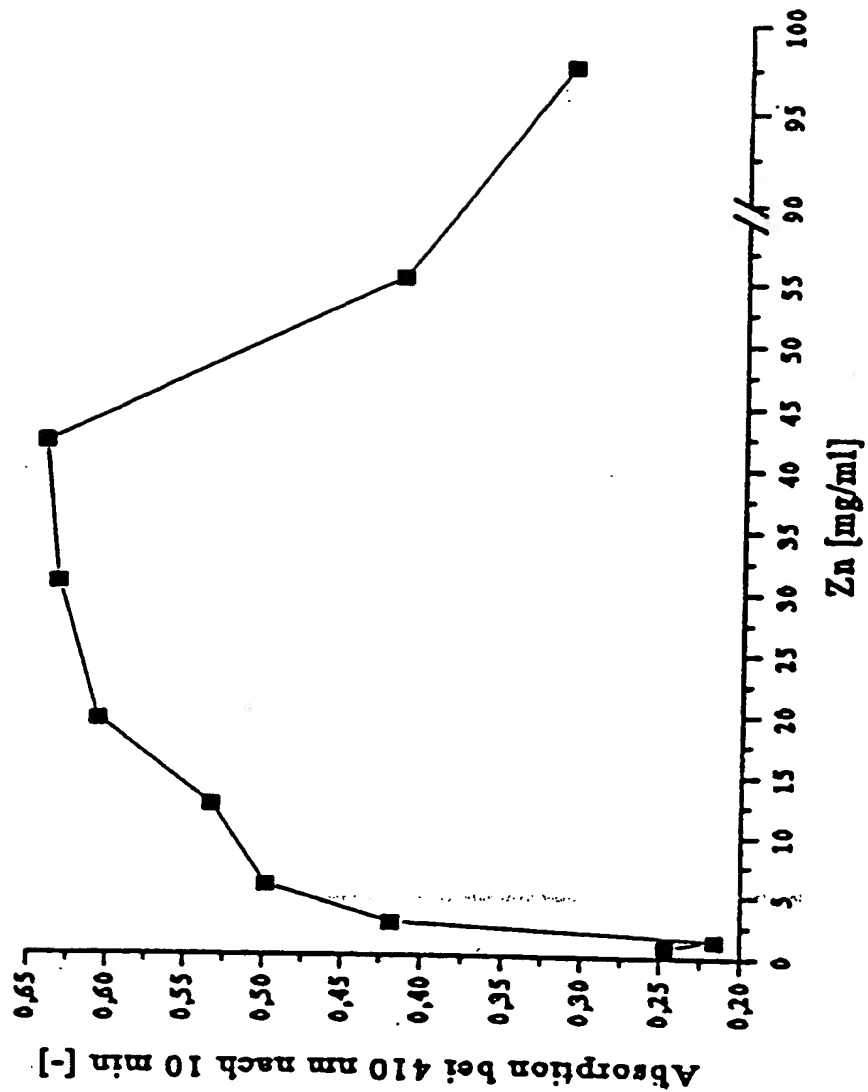


Fig.9

**BEST AVAILABLE COPY**

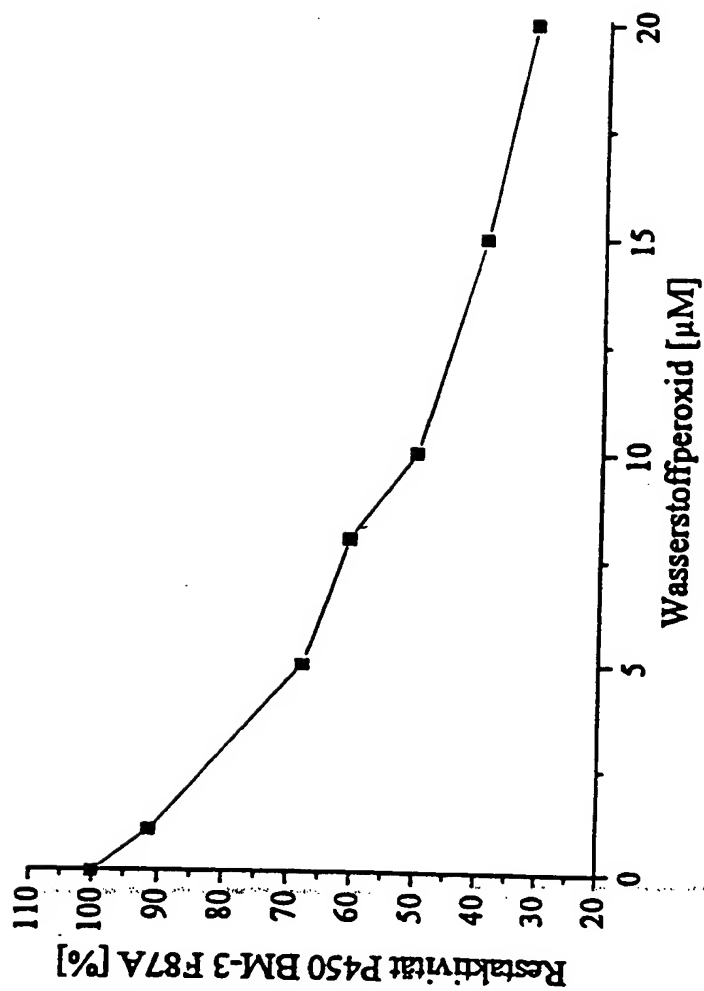


Fig.10

**BEST AVAILABLE COPY**

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Aktiengesellschaft

5 <120> Elektronendonorsystem für Enzyme und dessen Anwendung  
bei der biochemischen Umsetzung von Substraten

<130> M/40076

10 <140>  
<141>

<160> 35

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

20 <220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonukleotid für genomische Bacillus  
megaterium-DNA

25 <400> 1  
gtgaaagagg gatcccatga caattaaaga aatgcc 36

<210> 2  
30 <211> 38  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
35 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonukleotid für genomische Bacillus  
megaterium-DNA

<400> 2  
gcctcttgga tccttaccca gcccacacgt cttttgcg 38

40 <210> 3  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

45 <220>

**BEST AVAILABLE COPY**

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für  
Sequenzierung

<400> 3

5 gtacgtgatt ttgcaggag

19

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

10 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für  
Sequenzierung

15

<400> 4

ggctatcatg cgatgatggt

20

<210> 5

20 <211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

25 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für  
Sequenzierung

<400> 5

cccagcttat gatgaaaac

19

30

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

35

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für  
Sequenzierung

<400> 6

40 ggaaaagatc cagaaacggg

20

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

45 <213> Künstliche Sequenz

<220>

**BEST AVAILABLE COPY**



<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für Sequenzierung

<400> 7

5 gtcggcatgg tcttaaag

19

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

10 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für Sequenzierung

15

<400> 8

attcctcagc ttcaccgtga

20

<210> 9

20 <211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

25 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für Sequenzierung

<400> 9

cttggcggta ttccttcac

19

30

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

35

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für Sequenzierung

<400> 10

atttgcaccg caggtcgcaa

20

40

<210> 11

<211> 17

<212> DNA

45 <213> Künstliche Sequenz

<220>

**BEST AVAILABLE COPY**

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für Sequenzierung

<400> 11

5 ctgggctact acgtatc

17

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

10 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für Sequenzierung

15

<400> 12

ttcaatttgt cgacagcgcc

20

<210> 13

20 <211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

25 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für Sequenzierung

<400> 13

gaaggagatc atttaggtg

19

30

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

35

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für Sequenzierung

<400> 14

40 tcgcgcaatg gctgctaaaa

20

<210> 15

<211> 18

45 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

**BEST AVAILABLE COPY**

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für Sequenzierung

<400> 15

5 cgatttcttc atcacctc

18

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

10 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für Sequenzierung

15

<400> 16

ctgccaaaag accctgaaac

20

<210> 17

20 <211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

25 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für Sequenzierung

<400> 17

accatcatcg catgatagcc

20

30 <210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

35 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für Sequenzierung

<400> 18

cccgtttctg gatcttttcc

20

40

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

45 <213> Künstliche Sequenz

**BEST AVAILABLE COPY**

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für Sequenzierung

5 &lt;400&gt; 19

tcacggtgaa gctgaggaat

20

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 20

10 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für Sequenzierung

15

&lt;400&gt; 20

ttgcgacctg cggcgcaaat

20

20 &lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

25 &lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für Sequenzierung

&lt;400&gt; 21

ggcgctgtcg acaaattgaa

20

30

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

35 &lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für Sequenzierung

40 &lt;400&gt; 22

ttttagcagc cattgcgcga

20

&lt;210&gt; 23

45 &lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

**BEST AVAILABLE COPY**



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für Sequenzierung

5 &lt;400&gt; 23

gtttcaggggt cttttggcag

20

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 36

10 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonukleotid für Tag am C-Terminus

15

&lt;400&gt; 24

gtgaaagagg gatcccatga caattaaaga aatgcc

36

20 &lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 42

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

25 &lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonukleotid für Tag am C-Terminus

&lt;400&gt; 25

cggaattctt aacgacgacg acgacgacgc ccagcccaca cg

42

30

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

35 &lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonukleotid für Tag am C-Terminus

40 &lt;400&gt; 26

gtgaaagagg gatcccatga caattaaaga aatgcc

36

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 42

45 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

**BEST AVAILABLE COPY**

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonukleotid für Tag am C-Terminus

5 &lt;400&gt; 27

cggaattctt attcttcttc ttcttcttcc ccagcccaca cg

42

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 36

10 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

15 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonukleotid für Tag am C-Terminus

&lt;400&gt; 28

gtgaaagagg gatcccatga caattaaaga aatgcc

36

20 &lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 42

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

25 &lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonukleotid für Tag am C-Terminus

&lt;400&gt; 29

30 cgcaattctt aatgatgatg atgatgatgc ccagcccaca cg

42

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 38

&lt;212&gt; DNA

35 &lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonukleotid für Tag am C-Terminus

40 &lt;400&gt; 30

gtctcagcgt gagaccccca gccacacgt cttttgcc

38

&lt;210&gt; 31

45 &lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

**BEST AVAILABLE COPY**

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonukleotid für Tag am C-Terminus

5 &lt;400&gt; 31

gtgaaagagg tctccaatga caattaaaga aatgcc

36

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 34

10 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für  
P450 BM-3 Punktmutante F87A

15

&lt;400&gt; 32

gcaggagacg gggtggccac aagctggacg catg

34

20 &lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 34

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

25 &lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für  
P450 BM-3 Punktmutante F87A

&lt;400&gt; 33

catgcgtcca gcttgtggcc aacccgtctc ctgc

34

30

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 3150

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Bacillus megaterium.

35

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (4)..(3150)

&lt;400&gt; 34

40 atg aca att aaa gaa atg cct cag cca aaa acg ttt gga gag ctt aaa 48  
Thr Ile Lys Glu Met Pro Gln Pro Lys Thr Phe Gly Glu Leu Lys  
1 5 10 15

aat tta ccg tta tta aac aca gat aaa ccg gtt caa gct ttg atg aaa 96

45 Asn Leu Pro Leu Leu Asn Thr Asp Lys Pro Val Gln Ala Leu Met Lys  
20 25 30

att gcg gat gaa tta gga gaa atc ttt aaa ttc gag gcg cct ggt cgt 144

**BEST AVAILABLE COPY**

	Ile	Ala	Asp	Glu	Leu	Gly	Glu	Ile	Phe	Lys	Phe	Glu	Ala	Pro	Gly	Arg	
				35					10 40					45			
	gta	acg	cgc	tac	tta	tca	agt	cag	cgt	cta	att	aaa	gaa	gca	tgc	gat	192
5	Val	Thr	Arg	Tyr	Leu	Ser	Ser	Gln	Arg	Leu	Ile	Lys	Glu	Ala	Cys	Asp	
			50					55					60				
	gaa	tca	cgc	ttt	gat	aaa	aac	tta	agt	caa	gcg	ctt	aaa	ttt	gta	cgt	240
	Glu	Ser	Arg	Phe	Asp	Lys	Asn	Leu	Ser	Gln	Ala	Leu	Lys	Phe	Val	Arg	
			65				70					75					
10	gat	ttt	gca	gga	gac	ggg	tta	ttt	aca	agc	tgg	acg	cat	gaa	aaa	aat	288
	Asp	Phe	Ala	Gly	Asp	Gly	Leu	Phe	Thr	Ser	Trp	Thr	His	Glu	Lys	Asn	
	80					85					90					95	
	tgg	aaa	aaa	gcg	cat	aat	atc	tta	ctt	cca	agc	ttc	agt	cag	cag	gca	336
15	Trp	Lys	Lys	Ala	His	Asn	Ile	Leu	Leu	Pro	Ser	Phe	Ser	Gln	Gln	Ala	
					100					105					110		
	atg	aaa	ggc	tat	cat	gcg	atg	atg	gtc	gat	atc	gcc	gtg	cag	ctt	gtt	384
20	Met	Lys	Gly	Tyr	His	Ala	Met	Met	Val	Asp	Ile	Ala	Val	Gln	Leu	Val	
				115					120					125			
	caa	aag	tgg	gag	cgt	cta	aat	gca	gat	gag	cat	att	gaa	gta	ccg	gaa	432
	Gln	Lys	Trp	Glu	Arg	Leu	Asn	Ala	Asp	Glu	His	Ile	Glu	Val	Pro	Glu	
			130					135					140				
25	gac	atg	aca	cgt	tta	acg	ctt	gat	aca	att	ggc	ctt	tgc	ggc	ttt	aac	480
	Asp	Met	Thr	Arg	Leu	Thr	Leu	Asp	Thr	Ile	Gly	Leu	Cys	Gly	Phe	Asn	
		145					150					155					
	tat	cgc	ttt	aac	agc	ttt	tac	cga	gat	cag	cct	cat	cca	ttt	att	aca	528
30	Tyr	Arg	Phe	Asn	Ser	Phe	Tyr	Arg	Asp	Gln	Pro	His	Pro	Phe	Ile	Thr	
	160					165				170					175		
	agt	atg	gtc	cgt	gca	ctg	gat	gaa	gca	atg	aac	aag	ctg	cag	cga	gca	576
	Ser	Met	Val	Arg	Ala	Leu	Asp	Glu	Ala	Met	Asn	Lys	Leu	Gln	Arg	Ala	
35					180				185					190			
	aat	cca	gac	gac	cca	gct	tat	gat	gaa	aac	aag	cgc	cag	ttt	caa	gaa	624
	Asn	Pro	Asp	Asp	Pro	Ala	Tyr	Asp	Glu	Asn	Lys	Arg	Gln	Phe	Gln	Glu	
			195					200					205				
40	gat	atc	aag	gtg	atg	aac	gac	cta	gta	gat	aaa	att	att	gca	gat	cgc	672
	Asp	Ile	Lys	Val	Met	Asn	Asp	Leu	Val	Asp	Lys	Ile	Ile	Ala	Asp	Arg	
			210				215						220				
	aaa	gca	agc	ggc	gaa	caa	agc	gat	gat	tta	tta	acg	cat	atg	cta	aac	720
45	Lys	Ala	Ser	Gly	Glu	Gln	Ser	Asp	Asp	Leu	Leu	Thr	His	Met	Leu	Asn	
		225					230					235					
	gga	aaa	gat	cca	gaa	acg	ggc	gag	ccg	ctt	gat	gac	gag	aac	att	cgc	768

**BEST AVAILABLE COPY**



	Gly	Lys	Asp	Pro	Glu	Thr	Gly	Glu	Pro	Leu	Asp	Asp	Glu	Asn	Ile	Arg	
	240					245					250					255	
	tat	caa	att	att	aca	ttc	tta	att	gcg	gga	cac	gaa	aca	aca	agt	ggc	816
5	Tyr	Gln	Ile	Ile	Thr	Phe	Leu	Ile	Ala	Gly	His	Glu	Thr	Thr	Ser	Gly	
					260					265					270		
	ctt	tta	tca	ttt	gcg	ctg	tat	ttc	tta	gtg	aaa	aat	cca	cat	gta	tta	864
	Leu	Leu	Ser	Phe	Ala	Leu	Tyr	Phe	Leu	Val	Lys	Asn	Pro	His	Val	Leu	
					275					280					285		
10	caa	aaa	gca	gca	gaa	gaa	gca	gca	cga	gtt	cta	gta	gat	cct	gtt	cca	912
	Gln	Lys	Ala	Ala	Glu	Glu	Ala	Ala	Arg	Val	Leu	Val	Asp	Pro	Val	Pro	
					290					295					300		
15	agc	tac	aaa	caa	gtc	aaa	cag	ctt	aaa	tat	gtc	ggc	atg	gtc	tta	aac	960
	Ser	Tyr	Lys	Gln	Val	Lys	Gln	Leu	Lys	Tyr	Val	Gly	Met	Val	Leu	Asn	
					305					310					315		
	gaa	gcg	ctg	cgc	tta	tgg	cca	act	gct	cct	gcg	ttt	tcc	cta	tat	gca	1008
	Glu	Ala	Leu	Arg	Leu	Trp	Pro	Thr	Ala	Pro	Ala	Phe	Ser	Leu	Tyr	Ala	
20	320					325					330					335	
	aaa	gaa	gat	acg	gtg	ctt	gga	gga	gaa	tat	cct	tta	gaa	aaa	ggc	gac	1056
	Lys	Glu	Asp	Thr	Val	Leu	Gly	Gly	Glu	Tyr	Pro	Leu	Glu	Lys	Gly	Asp	
					340					345					350		
25	gaa	cta	atg	gtt	ctg	att	cct	cag	ctt	cac	cgt	gat	aaa	aca	att	tgg	1104
	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Ile	Pro	Gln	Leu	His	Arg	Asp	Lys	Thr	Ile	Trp	
					355					360					365		
	gga	gac	gat	gtg	gaa	gag	ttc	cgt	cca	gag	cgt	ttt	gaa	aat	cca	agt	1152
30	Gly	Asp	Asp	Val	Glu	Glu	Phe	Arg	Pro	Glu	Arg	Phe	Glu	Asn	Pro	Ser	
					370					375					380		
	gcg	att	ccg	cag	cat	gcg	ttt	aaa	ccg	ttt	gga	aac	ggc	cag	cgt	gcg	1200
	Ala	Ile	Pro	Gln	His	Ala	Phe	Lys	Pro	Phe	Gly	Asn	Gly	Gln	Arg	Ala	
35					385					390					395		
	tgt	atc	ggc	cag	cag	ttc	gct	ctt	cat	gaa	gca	acg	ctg	gta	ctt	ggc	1248
	Cys	Ile	Gly	Gln	Gln	Phe	Ala	Leu	His	Glu	Ala	Thr	Leu	Val	Leu	Gly	
					400					405					410		415
40	atg	atg	cta	aaa	cac	ttt	gac	ttt	gaa	gat	cat	aca	aac	tac	gag	ctg	1296
	Met	Met	Leu	Lys	His	Phe	Asp	Phe	Glu	Asp	His	Thr	Asn	Tyr	Glu	Leu	
					420					425					430		
	gat	att	aaa	gaa	act	tta	acg	tta	aaa	cct	gaa	ggc	ttt	gtg	gta	aaa	1344
45	Asp	Ile	Lys	Glu	Thr	Leu	Thr	Leu	Lys	Pro	Glu	Gly	Phe	Val	Val	Lys	
					435					440					445		
	gca	aaa	tcg	aaa	aaa	att	ccg	ctt	ggc	ggc	att	cct	tca	cct	agc	act	1392

**BEST AVAILABLE COPY**

	Ala	Lys	Ser	Lys	Lys	Ile	Pro	Leu	Gly	Gly	Ile	Pro	Ser	Pro	Ser	Thr	
	450							455					460				
	gaa	cag	tct	gct	aaa	aaa	gta	cgc	aaa	aag	gca	gaa	aac	gct	cat	aat	1440
5	Glu	Gln	Ser	Ala	Lys	Lys	Val	Arg	Lys	Lys	Ala	Glu	Asn	Ala	His	Asn	
	465						470					475					
	acg	ccg	ctg	ctt	gtg	cta	tac	ggg	tca	aat	atg	gga	aca	gct	gaa	gga	1488
	Thr	Pro	Leu	Leu	Val	Leu	Tyr	Gly	Ser	Asn	Met	Gly	Thr	Ala	Glu	Gly	
	480					485					490					495	
10	acg	gcg	cgt	gat	tta	gca	gat	att	gca	atg	agc	aaa	gga	ttt	gca	ccg	1536
	Thr	Ala	Arg	Asp	Leu	Ala	Asp	Ile	Ala	Met	Ser	Lys	Gly	Phe	Ala	Pro	
					500					505					510		
15	cag	gtc	gca	acg	ctt	gat	tca	cac	gcc	gga	aat	ctt	ccg	cgc	gaa	gga	1584
	Gln	Val	Ala	Thr	Leu	Asp	Ser	His	Ala	Gly	Asn	Leu	Pro	Arg	Glu	Gly	
				515					520					525			
	gct	gta	tta	att	gta	acg	gcg	tct	tat	aac	ggg	cat	ccg	cct	gat	aac	1632
	Ala	Val	Leu	Ile	Val	Thr	Ala	Ser	Tyr	Asn	Gly	His	Pro	Pro	Asp	Asn	
20		530						535					540				
	gca	aag	caa	ttt	gtc	gac	tgg	tta	gac	caa	gcg	tct	gct	gat	gaa	gta	1680
	Ala	Lys	Gln	Phe	Val	Asp	Trp	Leu	Asp	Gln	Ala	Ser	Ala	Asp	Glu	Val	
	545						550					555					
25	aaa	ggc	gtt	cgc	tac	tcc	gta	ttt	gga	tgc	ggc	gat	aaa	aac	tgg	gct	1728
	Lys	Gly	Val	Arg	Tyr	Ser	Val	Phe	Gly	Cys	Gly	Asp	Lys	Asn	Trp	Ala	
	560					565				570						575	
	act	acg	tat	caa	aaa	gtg	cct	gct	ttt	atc	gat	gaa	acg	ctt	gcc	gct	1776
30	Thr	Thr	Tyr	Gln	Lys	Val	Pro	Ala	Phe	Ile	Asp	Glu	Thr	Leu	Ala	Ala	
				580						585					590		
	aaa	ggg	gca	gaa	aac	atc	gct	gac	cgc	ggg	gaa	gca	gat	gca	agc	gac	1824
	Lys	Gly	Ala	Glu	Asn	Ile	Ala	Asp	Arg	Gly	Glu	Ala	Asp	Ala	Ser	Asp	
35				595					600					605			
	gac	ttt	gaa	ggc	aca	tat	gaa	gaa	tgg	cgt	gaa	cat	atg	tgg	agt	gac	1872
	Asp	Phe	Glu	Gly	Thr	Tyr	Glu	Glu	Trp	Arg	Glu	His	Met	Trp	Ser	Asp	
	610						615					620					
40	gta	gca	gcc	tac	ttt	aac	ctc	gac	att	gaa	aac	agt	gaa	gat	aat	aaa	1920
	Val	Ala	Ala	Tyr	Phe	Asn	Leu	Asp	Ile	Glu	Asn	Ser	Glu	Asp	Asn	Lys	
	625						630					635					
	tct	act	ctt	tca	ctt	caa	ttt	gtc	gac	agc	gcc	gcg	gat	atg	ccg	ctt	1968
45	Ser	Thr	Leu	Ser	Leu	Gln	Phe	Val	Asp	Ser	Ala	Ala	Asp	Met	Pro	Leu	
	640					645					650				655		
	gcg	aaa	atg	cac	ggg	gcg	ttt	tca	acg	aac	gtc	gta	gca	agc	aaa	gaa	2016

**BEST AVAILABLE COPY**

	Ala	Lys	Met	His	Gly	Ala	Phe	Ser	Thr	Asn	Val	Val	Ala	Ser	Lys	Glu	
					660					665					670		
	ctt	caa	cag	cca	ggc	agt	gca	cga	agc	acg	cga	cat	ctt	gaa	att	gaa	2064
5	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ser	Ala	Arg	Ser	Thr	Arg	His	Leu	Glu	Ile	Glu	
				675					680					685			
	ctt	cca	aaa	gaa	gct	tct	tat	caa	gaa	gga	gat	cat	tta	ggg	gtt	att	2112
	Leu	Pro	Lys	Glu	Ala	Ser	Tyr	Gln	Glu	Gly	Asp	His	Leu	Gly	Val	Ile	
				690				695					700				
10																	
	cct	cgc	aac	tat	gaa	gga	ata	gta	aac	cgt	gta	aca	gca	agg	ttc	ggc	2160
	Pro	Arg	Asn	Tyr	Glu	Gly	Ile	Val	Asn	Arg	Val	Thr	Ala	Arg	Phe	Gly	
				705			710					715					
	cta	gat	gca	tca	cag	caa	atc	cgt	ctg	gaa	gca	gaa	gaa	gaa	aaa	tta	2208
15	Leu	Asp	Ala	Ser	Gln	Gln	Ile	Arg	Leu	Glu	Ala	Glu	Glu	Glu	Lys	Leu	
					720		725				730					735	
	gct	cat	ttg	cca	ctc	gct	aaa	aca	gta	tcc	gta	gaa	gag	ctt	ctg	caa	2256
	Ala	His	Leu	Pro	Leu	Ala	Lys	Thr	Val	Ser	Val	Glu	Glu	Leu	Leu	Gln	
20					740					745					750		
	tac	gtg	gag	ctt	caa	gat	cct	gtt	acg	cgc	acg	cag	ctt	cgc	gca	atg	2304
	Tyr	Val	Glu	Leu	Gln	Asp	Pro	Val	Thr	Arg	Thr	Gln	Leu	Arg	Ala	Met	
					755				760					765			
25																	
	gct	gct	aaa	acg	gtc	tgc	ccg	ccg	cat	aaa	gta	gag	ctt	gaa	gcc	ttg	2352
	Ala	Ala	Lys	Thr	Val	Cys	Pro	Pro	His	Lys	Val	Glu	Leu	Glu	Ala	Leu	
				770				775					780				
	ctt	gaa	aag	caa	gcc	tac	aaa	gaa	caa	gtg	ctg	gca	aaa	cgt	tta	aca	2400
30	Leu	Glu	Lys	Gln	Ala	Tyr	Lys	Glu	Gln	Val	Leu	Ala	Lys	Arg	Leu	Thr	
				785			790					795					
	atg	ctt	gaa	ctg	ctt	gaa	aaa	tac	ccg	gcg	tgt	gaa	atg	aaa	ttc	agc	2448
	Met	Leu	Glu	Leu	Leu	Glu	Lys	Tyr	Pro	Ala	Cys	Glu	Met	Lys	Phe	Ser	
35					800		805				810					815	
	gaa	ttt	atc	gcc	ctt	ctg	cca	agc	ata	cgc	ccg	cgc	tat	tac	tcg	att	2496
	Glu	Phe	Ile	Ala	Leu	Leu	Pro	Ser	Ile	Arg	Pro	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ile	
					820					825					830		
40																	
	tct	tca	tca	cct	cgt	gtc	gat	gaa	aaa	caa	gca	agc	atc	acg	gtc	agc	2544
	Ser	Ser	Ser	Pro	Arg	Val	Asp	Glu	Lys	Gln	Ala	Ser	Ile	Thr	Val	Ser	
				835					840					845			
	gtt	gtc	tca	gga	gaa	gcg	tgg	agc	gga	tat	gga	gaa	tat	aaa	gga	att	2592
45	Val	Val	Ser	Gly	Glu	Ala	Trp	Ser	Gly	Tyr	Gly	Glu	Tyr	Lys	Gly	Ile	
				850				855					860				
	gcg	tcg	aac	tat	ctt	gcc	gag	ctg	caa	gaa	gga	gat	acg	att	acg	tcg	2640

**BEST AVAILABLE COPY**

14

	Ala	Ser	Asn	Tyr	Leu	Ala	Glu	Leu	Gln	Glu	Gly	Asp	Thr	Ile	Thr	Cys	
	865						870					875					
	ttt	att	tcc	aca	ccg	cag	tca	gaa	ttt	acg	ctg	cca	aaa	gac	cct	gaa	2688
5	Phe	Ile	Ser	Thr	Pro	Gln	Ser	Glu	Phe	Thr	Leu	Pro	Lys	Asp	Pro	Glu	
	880					885					890					895	
	acg	ccg	ctt	atc	atg	gtc	gga	ccg	gga	aca	ggc	gtc	gcg	ccg	ttt	aga	2736
	Thr	Pro	Leu	Ile	Met	Val	Gly	Pro	Gly	Thr	Gly	Val	Ala	Pro	Phe	Arg	
					900					905					910		
10	ggc	ttt	gtg	cag	gcg	cgc	aaa	cag	cta	aaa	gaa	caa	gga	cag	tca	ctt	2784
	Gly	Phe	Val	Gln	Ala	Arg	Lys	Gln	Leu	Lys	Glu	Gln	Gly	Gln	Ser	Leu	
				915					920					925			
	gga	gaa	gca	cat	tta	tac	ttc	ggc	tgc	cgt	tca	cct	cat	gaa	gac	tat	2832
15	Gly	Glu	Ala	His	Leu	Tyr	Phe	Gly	Cys	Arg	Ser	Pro	His	Glu	Asp	Tyr	
			930					935					940				
	ctg	tat	caa	gaa	gag	ctt	gaa	aac	gcc	caa	agc	gaa	ggc	atc	att	acg	2880
20	Leu	Tyr	Gln	Glu	Glu	Leu	Glu	Asn	Ala	Gln	Ser	Glu	Gly	Ile	Ile	Thr	
		945					950					955					
	ctt	cat	acc	gct	ttt	tct	cgc	atg	cca	aat	cag	ccg	aaa	aca	tac	gtt	2928
	Leu	His	Thr	Ala	Phe	Ser	Arg	Met	Pro	Asn	Gln	Pro	Lys	Thr	Tyr	Val	
	960					965					970				975		
25	cag	cac	gta	atg	gaa	caa	gac	ggc	aag	aaa	ttg	att	gaa	ctt	ctt	gat	2976
	Gln	His	Val	Met	Glu	Gln	Asp	Gly	Lys	Lys	Leu	Ile	Glu	Leu	Leu	Asp	
					980					985					990		
	caa	gga	gcg	cac	ttc	tat	att	tgc	gga	gac	gga	agc	caa	atg	gca	cct	3024
30	Gln	Gly	Ala	His	Phe	Tyr	Ile	Cys	Gly	Asp	Gly	Ser	Gln	Met	Ala	Pro	
			995						1000					1005			
	gcc	gtt	gaa	gca	acg	ctt	atg	aaa	agc	tat	gct	gac	gtt	cac	caa	gtg	3072
	Ala	Val	Glu	Ala	Thr	Leu	Met	Lys	Ser	Tyr	Ala	Asp	Val	His	Gln	Val	
35			1010					1015					1020				
	agt	gaa	gca	gac	gct	cgc	tta	tgg	ctg	cag	cag	cta	gaa	gaa	aaa	ggc	3120
	Ser	Glu	Ala	Asp	Ala	Arg	Leu	Trp	Leu	Gln	Gln	Leu	Glu	Glu	Lys	Gly	
		1025				1030					1035						
40	cga	tac	gca	aaa	gac	gtg	tgg	gct	ggg	taa							3150
	Arg	Tyr	Ala	Lys	Asp	Val	Trp	Ala	Gly								
	1040					1045											
45	<210>	35															
	<211>	1048															
	<212>	PRT															
	<213>	Bacillus megaterium															

**BEST AVAILABLE COPY**



&lt;400&gt; 35

Thr Ile Lys Glu Met Pro Gln Pro Lys Thr Phe Gly Glu Leu Lys Asn  
 1 5 10 15

5 Leu Pro Leu Leu Asn Thr Asp Lys Pro Val Gln Ala Leu Met Lys Ile  
 20 25 30

Ala Asp Glu Leu Gly Glu Ile Phe Lys Phe Glu Ala Pro Gly Arg Val  
 35 40 45

10 Thr Arg Tyr Leu Ser Ser Gln Arg Leu Ile Lys Glu Ala Cys Asp Glu  
 50 55 60

Ser Arg Phe Asp Lys Asn Leu Ser Gln Ala Leu Lys Phe Val Arg Asp  
 15 65 70 75 80

Phe Ala Gly Asp Gly Leu Phe Thr Ser Trp Thr His Glu Lys Asn Trp  
 85 90 95

20 Lys Lys Ala His Asn Ile Leu Leu Pro Ser Phe Ser Gln Gln Ala Met  
 100 105 110

Lys Gly Tyr His Ala Met Met Val Asp Ile Ala Val Gln Leu Val Gln  
 115 120 125

25 Lys Trp Glu Arg Leu Asn Ala Asp Glu His Ile Glu Val Pro Glu Asp  
 130 135 140

Met Thr Arg Leu Thr Leu Asp Thr Ile Gly Leu Cys Gly Phe Asn Tyr  
 145 150 155 160

30 Arg Phe Asn Ser Phe Tyr Arg Asp Gln Pro His Pro Phe Ile Thr Ser  
 165 170 175

Met Val Arg Ala Leu Asp Glu Ala Met Asn Lys Leu Gln Arg Ala Asn  
 180 185 190

35 Pro Asp Asp Pro Ala Tyr Asp Glu Asn Lys Arg Gln Phe Gln Glu Asp  
 195 200 205

Ile Lys Val Met Asn Asp Leu Val Asp Lys Ile Ile Ala Asp Arg Lys  
 210 215 220

40 Ala Ser Gly Glu Gln Ser Asp Asp Leu Leu Thr His Met Leu Asn Gly  
 225 230 235 240

Lys Asp Pro Glu Thr Gly Glu Pro Leu Asp Asp Glu Asn Ile Arg Tyr  
 45 245 250 255

Gln Ile Ile Thr Phe Leu Ile Ala Gly His Glu Thr Thr Ser Gly Leu  
 260 265 270

**BEST AVAILABLE COPY**

Leu Ser Phe Ala Leu Tyr Phe Leu Val Lys Asn Pro His Val Leu Gln  
 275 280 285

5 Lys Ala Ala Glu Glu Ala Ala Arg Val Leu Val Asp Pro Val Pro Ser  
 290 295 300

Tyr Lys Gln Val Lys Gln Leu Lys Tyr Val Gly Met Val Leu Asn Glu  
 305 310 315 320

10 Ala Leu Arg Leu Trp Pro Thr Ala Pro Ala Phe Ser Leu Tyr Ala Lys  
 325 330 335

Glu Asp Thr Val Leu Gly Gly Glu Tyr Pro Leu Glu Lys Gly Asp Glu  
 340 345 350

15 Leu Met Val Leu Ile Pro Gln Leu His Arg Asp Lys Thr Ile Trp Gly  
 355 360 365

Asp Asp Val Glu Glu Phe Arg Pro Glu Arg Phe Glu Asn Pro Ser Ala  
 370 375 380

20 Ile Pro Gln His Ala Phe Lys Pro Phe Gly Asn Gly Gln Arg Ala Cys  
 385 390 395 400

Ile Gly Gln Gln Phe Ala Leu His Glu Ala Thr Leu Val Leu Gly Met  
 405 410 415

25 Met Leu Lys His Phe Asp Phe Glu Asp His Thr Asn Tyr Glu Leu Asp  
 420 425 430

Ile Lys Glu Thr Leu Thr Leu Lys Pro Glu Gly Phe Val Val Lys Ala  
 435 440 445

Lys Ser Lys Lys Ile Pro Leu Gly Gly Ile Pro Ser Pro Ser Thr Glu  
 450 455 460

35 Gln Ser Ala Lys Lys Val Arg Lys Lys Ala Glu Asn Ala His Asn Thr  
 465 470 475 480

Pro Leu Leu Val Leu Tyr Gly Ser Asn Met Gly Thr Ala Glu Gly Thr  
 485 490 495

40 Ala Arg Asp Leu Ala Asp Ile Ala Met Ser Lys Gly Phe Ala Pro Gln  
 500 505 510

Val Ala Thr Leu Asp Ser His Ala Gly Asn Leu Pro Arg Glu Gly Ala  
 515 520 525

45 Val Leu Ile Val Thr Ala Ser Tyr Asn Gly His Pro Pro Asp Asn Ala  
 530 535 540

**BEST AVAILABLE COPY**

Lys Gln Phe Val Asp Trp Leu Asp Gln Ala Ser Ala Asp Glu Val Lys  
 545 550 555 560

Gly Val Arg Tyr Ser Val Phe Gly Cys Gly Asp Lys Asn Trp Ala Thr  
 565 570 575

Thr Tyr Gln Lys Val Pro Ala Phe Ile Asp Glu Thr Leu Ala Ala Lys  
 580 585 590

Gly Ala Glu Asn Ile Ala Asp Arg Gly Glu Ala Asp Ala Ser Asp Asp  
 595 600 605

Phe Glu Gly Thr Tyr Glu Glu Trp Arg Glu His Met Trp Ser Asp Val  
 610 615 620

Ala Ala Tyr Phe Asn Leu Asp Ile Glu Asn Ser Glu Asp Asn Lys Ser  
 625 630 635 640

Thr Leu Ser Leu Gln Phe Val Asp Ser Ala Ala Asp Met Pro Leu Ala  
 645 650 655

Lys Met His Gly Ala Phe Ser Thr Asn Val Val Ala Ser Lys Glu Leu  
 660 665 670

Gln Gln Pro Gly Ser Ala Arg Ser Thr Arg His Leu Glu Ile Glu Leu  
 675 680 685

Pro Lys Glu Ala Ser Tyr Gln Glu Gly Asp His Leu Gly Val Ile Pro  
 690 695 700

Arg Asn Tyr Glu Gly Ile Val Asn Arg Val Thr Ala Arg Phe Gly Leu  
 705 710 715 720

Asp Ala Ser Gln Gln Ile Arg Leu Glu Ala Glu Glu Glu Lys Leu Ala  
 725 730 735

His Leu Pro Leu Ala Lys Thr Val Ser Val Glu Glu Leu Leu Gln Tyr  
 740 745 750

Val Glu Leu Gln Asp Pro Val Thr Arg Thr Gln Leu Arg Ala Met Ala  
 755 760 765

Ala Lys Thr Val Cys Pro Pro His Lys Val Glu Leu Glu Ala Leu Leu  
 770 775 780

Glu Lys Gln Ala Tyr Lys Glu Gln Val Leu Ala Lys Arg Leu Thr Met  
 785 790 795 800

Leu Glu Leu Leu Glu Lys Tyr Pro Ala Cys Glu Met Lys Phe Ser Glu  
 805 810 815

Phe Ile Ala Leu Leu Pro Ser Ile Arg Pro Arg Tyr Tyr Ser Ile Ser

**BEST AVAILABLE COPY**

820

825

830

Ser Ser Pro Arg Val Asp Glu Lys Gln Ala Ser Ile Thr Val Ser Val  
 835 840 845

5

Val Ser Gly Glu Ala Trp Ser Gly Tyr Gly Glu Tyr Lys Gly Ile Ala  
 850 855 860

Ser Asn Tyr Leu Ala Glu Leu Gln Glu Gly Asp Thr Ile Thr Cys Phe  
 865 870 875 880

10

Ile Ser Thr Pro Gln Ser Glu Phe Thr Leu Pro Lys Asp Pro Glu Thr  
 885 890 895

Pro Leu Ile Met Val Gly Pro Gly Thr Gly Val Ala Pro Phe Arg Gly  
 900 905 910

15

Phe Val Gln Ala Arg Lys Gln Leu Lys Glu Gln Gly Gln Ser Leu Gly  
 915 920 925

Glu Ala His Leu Tyr Phe Gly Cys Arg Ser Pro His Glu Asp Tyr Leu  
 930 935 940

20

Tyr Gln Glu Glu Leu Glu Asn Ala Gln Ser Glu Gly Ile Ile Thr Leu  
 945 950 955 960

25

His Thr Ala Phe Ser Arg Met Pro Asn Gln Pro Lys Thr Tyr Val Gln  
 965 970 975

His Val Met Glu Gln Asp Gly Lys Lys Leu Ile Glu Leu Leu Asp Gln  
 980 985 990

30

Gly Ala His Phe Tyr Ile Cys Gly Asp Gly Ser Gln Met Ala Pro Ala  
 995 1000 1005

Val Glu Ala Thr Leu Met Lys Ser Tyr Ala Asp Val His Gln Val Ser  
 1010 1015 1020

35

Glu Ala Asp Ala Arg Leu Trp Leu Gln Gln Leu Glu Glu Lys Gly Arg  
 1025 1030 1035 1040

Tyr Ala Lys Asp Val Trp Ala Gly  
 1045

40

45

**BEST AVAILABLE COPY**



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

nal Application No

PCT/EP 00/07251

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/53 C12N11/14 C12N11/06 C12N9/02 C12Q1/26  
C12P7/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12Q C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, CAB Data, STRAND, BIOSIS, EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>FAULKNER KEVIN M ET AL: "Electrocatalytically driven omega-hydroxylation of fatty acids using cytochrome P450 4A1." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 92, no. 17, 1995, pages 7705-7709, XP002156161 1995 ISSN: 0027-8424 the whole document</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	1-19

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \* & \* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 December 2000

Date of mailing of the international search report

11/01/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hornig, H

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Inten Application No  
 PCT 00/07251

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>IWUOHA E I ET AL: "DRUG METABOLISM BIOSENSORS: ELECTROCHEMICAL REACTIVITIES OF CYTOCHROME P450CAM IMMOBILISED IN SYNTHETIC VESICULAR SYSTEMS" JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS, US, NEW YORK, NY, vol. 17, no. 6/07, 1998, pages 1101-1110, XP000874063 ISSN: 0731-7085 the whole document</p> <p>---</p>	1-9
A	<p>GB 2 312 960 A (BRITISH GAS PLC) 12 November 1997 (1997-11-12) the whole document</p> <p>---</p>	1-9
A	<p>SCHWANEBERG ULRICH ET AL: "A continuous spectrophotometric assay for P450 BM-3, a fatty acid hydroxylating enzyme, and its mutant F87A." ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 269, no. 2, 1 May 1999 (1999-05-01), pages 359-366, XP002156030 ISSN: 0003-2697 the whole document</p> <p>---</p>	20,21
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1996 FANG XIAOQJUN ET AL: "Dithionite-supported hydroxylation of palmitic acid by cytochrome P450BM-3." Database accession no. PREV199799317033 XP002156162 cited in the application abstract &amp; DRUG METABOLISM AND DISPOSITION, vol. 24, no. 11, 1996, pages 1282-1285, ISSN: 0090-9556</p> <p>---</p>	1-8
A	<p>GRAHAM-LORENCE SANDRA ET AL: "An active site substitution, F87V, converts cytochrome P450 BM-3 into a regio- and stereoselective (14S,15R)-arachidonic acid epoxxygenase." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 2, 1997, pages 1127-1135, XP002155914 ISSN: 0021-9258 the whole document</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	11-18

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 00/07251

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>OLIVER CATHERINE F ET AL: "A single mutation in cytochrome P450 BM3 changes substrate orientation in a catalytic intermediate and the regiospecificity of hydroxylation."  BIOCHEMISTRY,  vol. 36, no. 7, 1997, pages 1567-1572,  XP002131694  ISSN: 0006-2960  cited in the application  the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	11-18
A	<p>OLIVER CATHERINE F ET AL: "Engineering the substrate specificity of Bacillus megaterium cytochrome P-450 BM3: Hydroxylation of alkyl trimethylammonium compounds."  BIOCHEMICAL JOURNAL,  vol. 327, no. 2, 1997, pages 537-544,  XP002156031  ISSN: 0264-6021  the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	11-18
A	<p>WO 97 49832 A (UNIV KINGSTON ;PETKOVICH P MARTIN (CA)) 31 December 1997 (1997-12-31)  the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PC 00/07251

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB 2312960 A	12-11-1997	AU 716380 B	24-02-2000
		AU 2707897 A	05-12-1997
		CA 2254352 A	20-11-1997
		CZ 9803588 A	14-04-1999
		EP 0897537 A	24-02-1999
		WO 9743632 A	20-11-1997
		GB 2341181 A,B	08-03-2000
		GB 2341236 A,B	08-03-2000
		JP 2000511630 T	05-09-2000
		PL 329761 A	12-04-1999
		SK 154298 A	13-03-2000
WO 9749832 A	31-12-1997	US 6063606 A	16-05-2000
		AU 3162097 A	14-01-1998
		AU 3332197 A	14-01-1998
		CA 2257180 A	31-12-1997
		WO 9749815 A	31-12-1997
		EP 0910644 A	28-04-1999
		EP 0935676 A	18-08-1999
		ZA 9705541 A	03-02-1999
		ZA 9705542 A	09-12-1998
		BR 9709924 A	10-08-1999

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/07251

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/53 C12N11/14 C12N11/06 C12N9/02 C12Q1/26  
C12P7/64

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12Q C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, PAJ, CAB Data, STRAND, BIOSIS, EPO-Internal

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>FAULKNER KEVIN M ET AL: "Electrocatalytically driven omega-hydroxylation of fatty acids using cytochrome P450 4A1." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 92, Nr. 17, 1995, Seiten 7705-7709, XP002156161 1995 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-19



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe: Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

21. Dezember 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

11/01/2001

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hornig, H

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	IWUOHA E I ET AL: "DRUG METABOLISM BIOSENSORS: ELECTROCHEMICAL REACTIVITIES OF CYTOCHROME P450CAM IMMOBILISED IN SYNTHETIC VESICULAR SYSTEMS" JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS,US,NEW YORK, NY, Bd. 17, Nr. 6/07, 1998, Seiten 1101-1110, XP000874063 ISSN: 0731-7085 das ganze Dokument	1-9
A	GB 2 312 960 A (BRITISH GAS PLC) 12. November 1997 (1997-11-12) das ganze Dokument	1-9
A	SCHWANEBERG ULRICH ET AL: "A continuous spectrophotometric assay for P450 BM-3, a fatty acid hydroxylating enzyme, and its mutant F87A." ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, Bd. 269, Nr. 2, 1. Mai 1999 (1999-05-01), Seiten 359-366, XP002156030 ISSN: 0003-2697 das ganze Dokument	20,21
A	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1996 FANG XIAOQJUN ET AL: "Dithionite-supported hydroxylation of palmitic acid by cytochrome P450BM-3." Database accession no. PREV199799317033 XP002156162 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung & DRUG METABOLISM AND DISPOSITION, Bd. 24, Nr. 11, 1996, Seiten 1282-1285, ISSN: 0090-9556	1-8
A	GRAHAM-LORENCE SANDRA ET AL: "An active site substitution, F87V, converts cytochrome P450 BM-3 into a regio- and stereoselective (14S,15R)-arachidonic acid epoxygenase." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 272, Nr. 2, 1997, Seiten 1127-1135, XP002155914 ISSN: 0021-9258 das ganze Dokument	11-18

-/--

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	OLIVER CATHERINE F ET AL: "A single mutation in cytochrome P450 BM3 changes substrate orientation in a catalytic intermediate and the regiospecificity of hydroxylation." BIOCHEMISTRY, Bd. 36, Nr. 7, 1997, Seiten 1567-1572, XP002131694 ISSN: 0006-2960 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	11-18
A	OLIVER CATHERINE F ET AL: "Engineering the substrate specificity of Bacillus megaterium cytochrome P-450 BM3: Hydroxylation of alkyl trimethylammonium compounds." BIOCHEMICAL JOURNAL, Bd. 327, Nr. 2, 1997, Seiten 537-544, XP002156031 ISSN: 0264-6021 das ganze Dokument	11-18
A	WO 97 49832 A (UNIV KINGSTON ;PETKOVICH P MARTIN (CA)) 31. Dezember 1997 (1997-12-31) das ganze Dokument	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die derselben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

EP 00/07251

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
GB 2312960 A	12-11-1997	AU 716380 B	24-02-2000
		AU 2707897 A	05-12-1997
		CA 2254352 A	20-11-1997
		CZ 9803588 A	14-04-1999
		EP 0897537 A	24-02-1999
		WO 9743632 A	20-11-1997
		GB 2341181 A, B	08-03-2000
		GB 2341236 A, B	08-03-2000
		JP 2000511630 T	05-09-2000
		PL 329761 A	12-04-1999
		SK 154298 A	13-03-2000
WO 9749832 A	31-12-1997	US 6063606 A	16-05-2000
		AU 3162097 A	14-01-1998
		AU 3332197 A	14-01-1998
		CA 2257180 A	31-12-1997
		WO 9749815 A	31-12-1997
		EP 0910644 A	28-04-1999
		EP 0935676 A	18-08-1999
		ZA 9705541 A	03-02-1999
		ZA 9705542 A	09-12-1998
		BR 9709924 A	10-08-1999